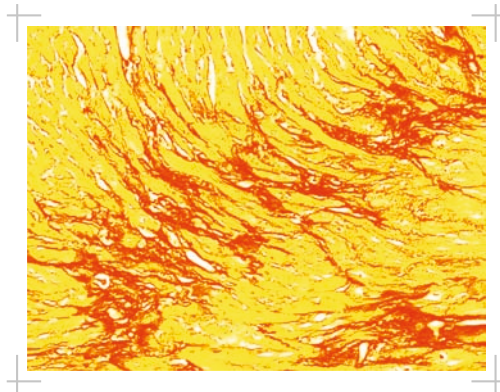


Die Rolle der microRNA21 in Rechtsherzhypertrophie und -fibrose

JULIA NEUMANN



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär - Physiologie und - Biochemie
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

und

dem Zentrum für Innere Medizin

Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Ralph Theo Schermuly

Die Rolle der microRNA21 in Rechtsherzhypertrophie und -fibrose

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Julia Neumann

Tierärztin aus Detmold

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. hc. Martin Kramer

Gutachter Prof. Dr. Martin Diener
Prof. Dr. Ralph T. Schermuly

Tag der Disputation: 30.04.2014

Meinen Eltern

Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten

Julia Neumann, Gießen 2014

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	19
2	LITERATURTEIL	21
2.1	AUFBAU UND FUNKTION DES HERZENS.....	21
2.2	PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN	22
2.2.1	HERZHYPERTROPHIE	22
2.2.2	MYOKARDFIBROSE.....	23
2.3	RECHTSHERZHYPERTROPHIE.....	23
2.4	PULMONALARTERIELLE HYPERTONIE (PAH)	26
2.4.1	KRANKHEITSBILD	26
2.4.2	BISHERIGE THERAPIEMÖGLICHKEITEN	29
2.5	MIRNAS ALLGEMEIN	30
2.6	MIRNAS IM HERZ.....	31
2.7	MIRNA-21	32
2.8	UNTERSUCHUNGEN ZUR MIRNA-21 IN BEZUG AUF LINKSHERZINSUFFIZIENZ	36
2.9	ZIEL DER ARBEIT	37
3	MATERIAL UND METHODEN.....	39
3.1	MATERIAL.....	39
3.1.1	VERSUCHSTIERE.....	39
3.1.2	TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG	39
3.1.2	INJEKTIONSLSÖSUNGEN UND SUBSTANZEN	40
3.1.3	ANTIKÖRPER	42
3.1.4	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	43
3.1.5	GERÄTE.....	45
3.1.6	OPERATIONSBESTECK.....	47
3.1.7	PUFFER	48
3.2	METHODEN	49

3.2.1	PULMONARY ARTERY BANDING (PAB)-MODELL.....	49
3.2.1.1	Durchführung der Operation.....	49
3.2.2	BEHANDLUNG/MEDIKAMENTÖSE INTERVENTION	52
3.2.2.1	Verwendete Substanzen	52
3.2.2.2	Intravenöse Injektion in die Schwanzvene	54
3.2.3	ECHOKARDIOGRAPHIE	54
3.2.3.1	Echokardiographie allgemein	54
3.2.3.2	Durchführung.....	55
3.2.3.3	Messparameter.....	58
3.2.4	HÄMODYNAMISCHE MESSUNG	60
3.2.4.1	Durchführung.....	60
3.2.4.2	Messparameter.....	61
3.2.5	PROBEN	61
3.2.5.1	Blutproben.....	61
3.2.5.2	Organproben	62
3.2.6	HISTOLOGIE	64
3.2.6.1	Organaufbereitung und Präparaterstellung.....	64
3.2.6.2	Picrosirius – Rot – Färbung – Quantifizierung der Fibrose	64
3.2.6.2.1	Durchführung.....	64
3.2.6.2.2	Auswertung	65
3.2.6.3	WGA – FITC – Färbung – Kardiomyozytendurchmesser.....	66
3.2.6.3.1	Durchführung.....	66
3.2.6.3.2	Auswertung	67
3.3	PROTEINBIOCHEMIE	67
3.3.1	PROBENHERSTELLUNG UND QUANTITATIVE PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG	67
3.3.2	SDS-PAGE (NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMID- GELELEKTROPHORESE).....	68
3.4	ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....	70
3.4.1	DURCHFÜHRUNG	70
3.4.2	AUSWERTUNG	72
3.5	REVERSE TRANSKRIPTASE POLYMERASE KETTEN REAKTION (RT-PCR)....	72

3.5.1. AUFREINIGUNG VON RNA AUS GEWEBE	72
3.5.2. RT-PCR	72
3.5.3. ANALYSE UND AUSWERTUNG DER RT-PCR DATEN	73
3.6 STATISTIK.....	74
4 ERGEBNISSE.....	75
4.1 ORGANWERTE	75
4.1.1 KÖRPERGEWICHT	75
4.1.2 VERÄNDERUNGEN DES KÖRPERGEWICHTS.....	76
4.1.3 TIBIALÄNGE.....	77
4.1.4 RV / (LV+S).....	78
4.2 HÄMODYNAMIK	79
4.2.1 HERZFREQUENZ	79
4.2.2 SYSTOLISCHER SYSTEMISCHER BLUTDRUCK	80
4.2.3 DIASTOLISCHER SYSTEMISCHER BLUTDRUCK	81
4.2.4 RECHTSVENTRIKULÄRER SYSTOLISCHER DRUCK.....	82
4.2.5 RECHTSVENTRIKULÄRER ENDDIASTOLISCHER DRUCK.....	83
4.3 ECHOKARDIOGRAPHIE	84
4.3.1 HERZZEITVOLUMEN	84
4.3.2 CARDIAC INDEX	85
4.3.3 RECHTSVENTRIKULÄRER INNERER DURCHMESSER	86
4.3.4 MYOCARDIAL PERFORMANCE INDEX (TeI)	87
4.3.5 TRICUSPID ANNULAR PLANE SYSTOLIC EXCURSION (TAPSE)	88
4.4 HISTOLOGIE.....	89
4.4.1 FIBROSE.....	89
4.4.2 KARDIOMYOZYTENDURCHMESSER	91
4.5 KNOCKDOWN-VERIFIZIERUNG MIRNA-21.....	94
4.6 ELISA NT-PROBNP	95
4.7 WESTERN BLOTS	96
4.7.1 ERK 1/2.....	96
4.7.2 P-ERK 1/2.....	98

4.7.3	SPROUTY 1	100
5	DISKUSSION	102
5.1	PULMONALARTERIELLES BANDING (PAB).....	102
5.2	VERSUCHSAUFBAU	103
5.3	HERSTELLUNG UND WIRKUNGSWEISE DER ANTAGOMIRE.....	104
5.4	ECHOKARDIOGRAPHIE	106
5.5	ERGEBNISSE	106
5.6	KLINISCHE RELEVANZ UND AUSBLICK.....	112
6	ZUSAMMENFASSUNG	115
7	SUMMARY	117
8	ANHANG	119
8.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	119
8.2	TABELLENVERZEICHNIS	121
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	122
10	DANKSAGUNG	127

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ANOVA	Analysis of variance
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BMPR2	bone morphognetic protein receptor 2
BNP	brain natriuretic peptide
BSA	Bovines Serumalbumin
C. elegans	Caenorhabditis elegans
ca.	circa
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO	Cardiac Output
CTEPH	Chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie
d.h.	das heißt
DAPI	Diamidinophenylindol
dia.	diastolisch
Echo	Echokardiographie
EGF	epidermal growth factor
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	Extracellular signal regulated kinase
ET	Ejektionszeit
FGF	Fibroblast growth factor

g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
Grb2	growth factor receptor –bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HF	Herzfrequenz
HI	Herzindex
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HMV	Herzminutenvolumen
HZV	Herzzeitvolumen
i.v.	intravenös
IgG	Immunglobulin G
Inj.	Injektion
IPAH	idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie
IVCT	isovolumetrische Kontraktionszeit
IVRT	isovolumetrische Relaxationszeit
kg	Kilogramm
LV	linker Ventrikel
mA	Milliampère
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
min.	Minute
miRISC	miRNA-induced-silencing complex
miRNA	microRibonukleinsäure

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
MPI	Myocardial Performance Index
mRNA	messengerRibonukleinsäure
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
PAB	Pulmonalarteriellles Banding
PAH	Pulmonalarterieller Hochdruck
PAP	Pulmonalarterieller Druck
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCH	pulmonal capillary Hemangiomatosis
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PH	Pulmonale Hypertonie
PVOD	pulmonal venoocclusive disease
Ras	Rat sarcoma
Raf	Rat fibrosarcoma
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	real-time Polymerase Chain Reaction
RV	rechter Ventrikel
RVEDP	rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck
RVID	rechtsventrikulärer innerer Durchmesser

RVP	rechtsventrikulärer Druck
S	Septum
S.	Seite
s.c.	subkutan
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean
Sos1	son of sevenless homolog 1
sys.	Systolisch
TAC	transaortic constriction
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung Tween 20
TGF β	transforming growth factor β
U/min.	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
WGA-FITC	Wheat germ agglutinin fluorescein labeled

1 Einleitung

MicroRNAs – kleine Ursache, große Wirkung

In den 90er Jahren stieß die Forschergruppe um Lee et al. auf eine neuartige Familie winzig kleiner, nicht-kodierender RNAs. Der erste Vertreter dieser Gruppe (lin-4) wurde 1993 in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt und es zeigte sich, dass diese winzige RNA trotz ihrer geringen Größe entscheidenden Einfluss auf verschiedenste physiologische Abläufe hatte. Ausgehend von dieser Entdeckung gerieten diese RNAs in den folgenden Jahren immer stärker in den Fokus der Wissenschaft (Lee et al., 1993).

MicroRNAs (miRNA) sind zwischen 21 und 25 Nukleotiden lang und regulieren die Genexpression in den meisten Fällen negativ auf posttranskriptionaler Ebene (He and Hannon, 2004). Sie beschleunigen den Abbau von messenger RNAs (mRNAs) durch komplementäre Basenpaarung und nehmen somit Einfluss auf die Proteinkodierung (Callis and Wang, 2008). In verschiedenen Studien konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass miRNAs eine große Rolle bei der Ausprägung unterschiedlicher Krankheiten spielen. Der Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von Gesunden und Erkrankten läßt häufig deutliche Unterschiede erkennen. Durch die Beeinflussung von miRNAs, sei es in hemmender oder in fördernder Weise, verspricht man sich daher eine Weiterentwicklung therapeutischer Strategien und verbesserte Behandlungsmöglichkeiten insbesondere für bis heute noch unheilbare Krankheiten. (Latronico and Condorelli, 2011)

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Beeinflussung von Rechtsherzerkrankungen durch miRNAs. Der rechte Ventrikel spielt im Rahmen verschiedenster Erkrankungen eine entscheidende Rolle, indem er entweder primär oder sekundär in Mitleidenschaft gezogen wird. Als primäre rechtsventrikuläre Erkrankungen sind rechtsventrikuläre Kardiomyopathien und rechtsventrikuläre Ischämie und Infarkte zu nennen. Wesentlich bedeutsamer sind jedoch die sekundären Erkrankungen des rechten Ventrikels, die in erster Linie im Zusammenhang mit pulmonalen Erkrankungen entstehen. Daher werden die Veränderungen am rechten Herzen, die als Folge von Lungenerkrankungen entstehen auch als Cor pulmonale bezeichnet. Obwohl gerade die Funktion des rechten Ventrikels als entscheidender Faktor hinsichtlich des Überlebens von Patienten mit Lungenerkrankungen wie Pulmonaler Arterieller Hypertonie (PAH) anzusehen ist, ist

bisher nur wenig über die zugrunde liegenden Pathomechanismen und mögliche Therapieansätze bekannt.

Daher soll es Ziel dieser Arbeit sein, die Beteiligung einzelner miRNAs an der Entstehung von rechtsventrikulärer Hypertrophie und Fibrose zu evaluieren und ausgehend davon Grundlagen für neuartige Therapiemöglichkeiten aufzuzeigen.

2 Literaturteil

2.1 Aufbau und Funktion des Herzens

Das Herz ist das zentrale Kreislauforgan des Körpers und liegt im Thorax innerhalb des Mediastinums. Es ist ein muskuläres Hohlorgan, welches aus einem rechten und linken Herzvorhof und einer rechten und linken Herzkammer besteht. Beide Seiten werden durch das Septum voneinander getrennt.

Embryologisch entstammen beide Anteile des Herzens aus verschiedenen Anlagen: Während sich das linke Herz aus dem primären Herzfeld entwickelt, entsteht das rechte Herz aus dem sekundären Herzfeld (Zaffran et al., 2004). Im fetalen Blutkreislauf wird das Blut über verschiedene Kurzschlüsse (Foramen ovale, Ductus arteriosus) an der Lunge vorbeigeleitet. Daher spielt zum Zeitpunkt der intrauterinen Entwicklung das rechte Herz eine übergeordnete Rolle, da es ca. 66% des Blutvolumens auswirft. Nach der Geburt ändert sich dieser Zustand: Durch die einsetzende Atmung sinkt der Widerstand in den Lungengefäßen, die fetalen Shuntverbindungen schließen sich und es kommt zu einem erhöhten Blutfluss im linken Herzen. Als Reaktion auf diese veränderten Verhältnisse entwickelt sich der linke Ventrikel zu einer dickwandigen, elliptischen Kontraktionskammer, während der rechte Ventrikel halbmondförmig, dünnwandig und elastisch, aber weniger kontraktile ist (Hines, 1991).

Histologisch lassen sich am Herzen 3 Schichten unterscheiden: das äußere Epikard, die mittlere Muskelschicht (Myokard) und das innere Endokard. Das gesamte Herz ist von außen vom serösen Perikard (Herzbeutel) umschlossen. Das linke Herz pumpt sauerstoffreiches Blut über die Aorta in den Körperkreislauf, während das rechte Herz das aus dem Körper zurückfließende sauerstoffarme Blut aufnimmt und es zur Anreicherung mit Sauerstoff dem Lungenkreislauf zuführt. Um zu gewährleisten, dass das Blut immer nur in eine Richtung gepumpt werden kann, befinden sich sowohl zwischen Vorhof und Kammer als auch am Übergang von der Kammer in die großen Gefäße Herzklappen, die einen Rückstrom des Blutes verhindern.

Die Pumpfunktion des Herzens beruht auf einer rhythmischen Aufeinanderfolge von Entspannung (Diastole) und Anspannung (Systole). Im Rahmen der Diastole ist der Herzmuskel erschlafft, so dass sich die Kammern mit Blut füllen können. Zum

Zeitpunkt der Systole kommt es zu einer Kontraktion des Herzens und das Blut wird in den Kreislauf ausgeworfen.

Dieser Rhythmus kommt durch Erregungen zustande, die im Herzen selbst entstehen. Das primäre Schrittmacherzentrum ist der Sinusknoten im rechten Vorhof. Dieser treibt das Herz im Ruhezustand mit einer Frequenz von ca. 70 Impulsen/min. an. Die generierte Erregung breitet sich dann zunächst über die Arbeitsmuskulatur der Vorhöfe aus, bevor sie über den Atrioventrikularknoten sowie mit Hilfe von His-Bündel, Tawara-Schenkeln und Purkinje-Fasern auf die gesamte Kammermuskulatur übertragen wird.

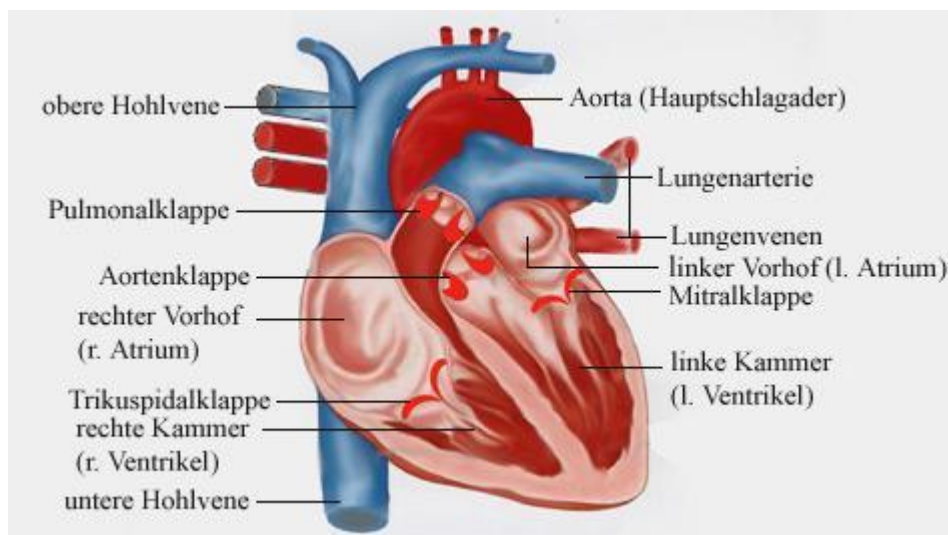


Abbildung 1: Anatomie des Herzens

© netDoctor.de

2.2 Pathologische Veränderungen

2.2.1 Herzhypertrophie

Das Herz reagiert sowohl auf physiologische als auch auf pathologische Reize mit Umbauprozessen, um sich an die veränderten Umstände anzupassen und seine Funktion in erforderlichem Maße aufrechterhalten zu können. Dieser Remodelling-Prozess wird als hypertrophes Wachstum bezeichnet, eine Muskelmassenzunahme im Ventrikel, die durch Größenzunahme der Kardiomyozyten bedingt ist. Initial ist diese

Veränderung kompensatorisch, um zu gewährleisten, dass trotz veränderter Umstände das Herzminutenvolumen auf normalem Niveau gehalten wird.

Bleiben pathologische Reize jedoch über einen längeren Zeitraum bestehen, ist das Herz ab einem gewissen Punkt nicht mehr in der Lage, die veränderten Umstände zu kompensieren und es kommt zur Beeinträchtigung der Herzfunktion, insbesondere auf inotroper und lusitroper Ebene und kann im schlimmsten Fall zum Herzversagen führen.

2.2.2 Myokardfibrose

Myokardfibrose wird definiert als vermehrte Ansammlung von extrazellulären Matrixproteinen im Herzen. In diesem Zusammenhang wird normales Herzmuskelgewebe durch bindegewebiges Narbengewebe ersetzt.

Hierdurch kommt es zu einer Versteifung des Herzmuskels; in der Diastole kann sich der Muskel nicht mehr vollständig entspannen und nicht mehr das komplette Blutvolumen aufnehmen. Diese Tatsache führt zu einer Beeinträchtigung der systolischen Funktion (vermindertes Auswurfvolumen) und endet schließlich im Herzversagen.

Des Weiteren wirkt sich die Myokardfibrose auch auf die Reizleitungs- und Erregungsleitung im Herzen aus. Durch die fibrotischen Bezirke wird die Reizüberleitung zwischen den einzelnen Muskelzellen erheblich gestört, was insbesondere die Entstehung von Arrhythmien begünstigt. Zudem wird durch die Einlagerung von Kollagen im Herzmuskel auch der Diffusionsweg für verschiedene Substrate und Sauerstoff vergrößert und führt somit zu einer negativen Energiebilanz (Ono et al., 2011).

2.3 Rechtsherzhypertrophie

Als Hypertrophie bezeichnet man die Vergrößerung eines Organes/Gewebes durch die Zunahme der Zellgröße. Eine Rechtsherzhypertrophie entsteht am häufigsten durch Pulmonalklappenstenose oder sekundär als Folge von chronischem Lungenbluthochdruck.

In beiden Fällen entsteht im Lungenkreislauf ein erhöhter Widerstand, gegen den das Herz arbeiten und einen erhöhten Druck aufbauen muss. Auf diese erhöhte Belastung reagiert das Herz initial mit einer kompensatorischen Hypertrophie des Myokards, um die erforderliche Leistung aufrechterhalten zu können. Diese Veränderung wird daher ursachengemäß auch als Cor pulmonale bezeichnet.

Im Vergleich zum linken Ventrikel hat der rechte Ventrikel eine dünnere Muskelwand und eine andere Form, da er gegen einen vergleichsweise niedrigeren Druck im Lungenkreislauf anpumpen muss. Er pumpt das gleiche Volumen wie der linke Ventrikel, benötigt dafür aber nur ca. 25 % der Arbeitsleistung im Vergleich zum linken Ventrikel (Voelkel et al., 2006).

Unter normalen Umständen kann sich das pulmonale Gefäßsystem ohne große Druckänderungen an veränderte Blutflussraten anpassen, so dass es nicht zu Drucküberlastung im rechten Ventrikel kommt. Unter körperlicher Anstrengung kann das Herzzeitvolumen, und damit der pulmonale Blutfluss, um das fünffache ansteigen. Der Widerstand in den pulmonalen Gefäßen erhöht sich jedoch nur minimal, da zusätzlich kleine Arteriolen und Kapillaren (Reservegefäße) geöffnet werden, um das gesteigerte Blutvolumen aufzunehmen (Haddad et al., 2008).

Das Laplace'sche Gesetz: $\sigma = P \times r / h$ (σ = Wandbelastung; P = intraluminaler Druck; r = innerer Kammerradius; h = Kammerwanddicke), verdeutlicht, dass ein Anstieg des intraluminalen Drucks in einem dünnwandigen Raum in einer deutlich erhöhten Wandbelastung resultiert (Bogaard et al., 2009).

Da eine erhöhte Wandbelastung nicht nur den Sauerstoffbedarf erhöht, sondern gleichzeitig auch die Myokardperfusion vermindert, muss der rechte Ventrikel mit einer Erhöhung der Wanddicke, in Form von Muskelmassenzunahme, auf den erhöhten Druck reagieren. Dadurch nimmt er eine rundere Form an und drückt den linken Ventrikel zusammen (Schermuly et al., 2011).

Der rechte Ventrikel kann diese Druckbelastung jedoch nicht über längere Zeit kompensieren: Die Kontraktionskraft nimmt mit der Zeit ab und es kommt zur Dilatation des rechten Ventrikels.

Da die durch die Ventrikeldilatation bedingte erhöhte Wandspannung den Sauerstoffbedarf des Myokards erhöht und gleichzeitig die Perfusion vermindert, ergibt

sich ein Teufelskreis aus immer stärker abnehmender Kontraktionsfähigkeit und Dilatation (Bogaard et al., 2009).

Eine ausgeprägte Dilatation des rechten Ventrikels nimmt zudem Einfluss auf die Funktion des linken Ventrikels. Durch Verschiebung des Septums nach links, wird das Volumen des linken Ventrikels verkleinert. Dieses führt zu einer verminderten Dehnbarkeit und einer geringeren Vorlast im linken Ventrikel, was schlussendlich die Auswurfleistung des linken Ventrikels deutlich reduziert (Haddad et al., 2008).

Rechtsherzversagen tritt ein, wenn die normale Hämodynamik trotz kompensatorischer Hypertrophie und Dilatation nicht mehr aufrechterhalten werden kann und das rechte Herz nicht mehr in der Lage ist, in erforderlichem Maße Blut aufzunehmen und auszuwerfen. Klinisch zeigen sich Flüssigkeitsrückstau (periphere Ödeme, Aszites, Anasarka), vermindertes Herzzeitvolumen und dadurch bedingte verminderte Belastungstoleranz sowie Vorhof- und Kammerarrhythmien (Haddad et al., 2008).

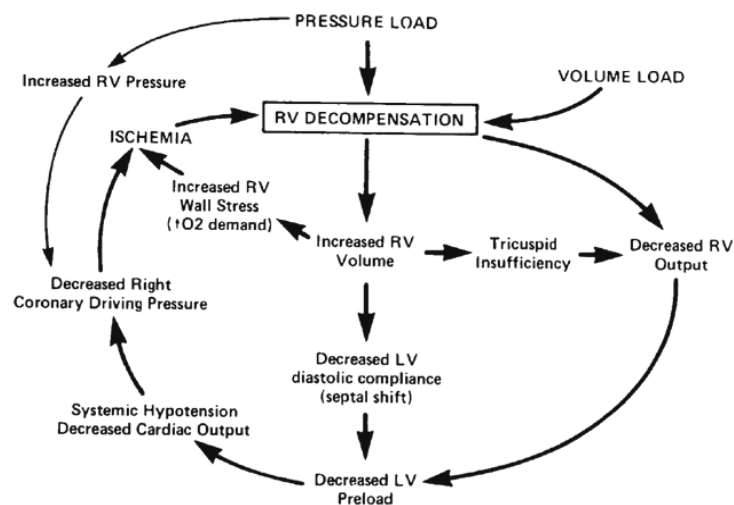


Abbildung 2: Pathophysiologie des Rechtsherzversagens
nach Wiedemann und Matthay, 1989

2.4 Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)

2.4.1 Krankheitsbild

Vom Krankheitsbild der PAH sind weltweit ca. 100 Millionen Menschen betroffen (Schermuly et al., 2011). Definitionsgemäß spricht man von PAH bei einem mittleren Pulmonalarteriendruck von über 25mmHg (Hoeper et al., 2011). Es werden unterschiedliche Ursachen für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich gemacht, die nach der Klassifikation des 4th World Symposium on Pulmonary Hypertension in Dana Point, CA, USA, 2008 in 5 Gruppen eingeteilt werden:

1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)

1.1 Idiopathische PAH

1.2 Hereditäre PAH

1.2.1 BMPR2-Mutationen

1.2.2 ALK1, Endoglin-Mutationen (mit und ohne hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie)

1.2.3 Unbekannte Mutationen

1.3 durch Medikamente und Toxine verursacht

1.4 assoziiert mit:

1.4.1 Bindegewebserkrankungen

1.4.2 HIV-Infektionen

1.4.3 Portaler Hypertension

1.4.4 Angeborenen Herzfehlern

1.4.5 Schistosomiasis

1.4.6 Chronisch hämolytischer Anämie

1.5 Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen

1'. Pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)

2. Pulmonale Hypertonie infolge Linksherzerkrankung

- 2.1 Systolische Dysfunktion
- 2.2 Diastolische Dysfunktion
- 2.3 Valvuläre Erkrankungen
- 3. Pulmonale Hypertonie infolge Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie**
 - 3.1 Chronische obstruktive Lungenerkrankungen
 - 3.2 Interstitielle Lungenerkrankungen
 - 3.3 Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktiv/obstruktivem Muster
 - 3.4 Schlafbezogene Atemstörungen
 - 3.5 Alveoläre Hypoventilationssyndrome
 - 3.6 Chronischer Aufenthalt in großer Höhe
 - 3.7 Fehlentwicklungen
- 4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)**
- 5. Pulmonale Hypertonie mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus**
 - 5.1 Hämatologische Erkrankungen: Myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
 - 5.2 Systemische Erkrankungen, Sarkoidose, pulmonale Langerhanszell-Histiozytose, Lymphangioleiomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitiden
 - 5.3 Metabolische Störungen: Glykogen-Speicherkrankheiten, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
 - 5.4 Andere: Tumorobstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen mit Hämodialyse

Alle Formen der PAH sind gekennzeichnet durch eine übermäßige Vasokonstriktion und Remodellingprozesse im Bereich der Lungengefäße. Diese Remodellingprozesse erstrecken sich auf alle Schichten der Gefäßwände und sind beispielsweise durch

Endothelverletzungen, Thrombose und Entzündungsprozesse bedingt. Es kommt zu proliferativen und obstruktiven Veränderungen in Endothel, glatten Muskelzellen und Fibroblasten (Schannwell et al., 2007), (Schermyly et al., 2011). Hierdurch entwickelt sich im Lungenkreislauf ein erhöhter Widerstand. Um die Auswurfleistung konstant zu halten, muss das rechte Herz mit höherem Druck gegen diesen Widerstand anarbeiten. Hieraus resultiert initial eine kompensatorische Hypertrophie des Myokards. Diese Veränderung wird daher ursachengemäß auch als Cor pulmonale bezeichnet (Budev et al., 2003). Der kompensatorischen Phase der Hypertrophie folgt nach einiger Zeit die Dekompensation, gekennzeichnet durch Dilatation des Herzmuskels und verminderte Kontraktionsfähigkeit. Klinisch äußert sich dieses Stadium, insbesondere bedingt durch eine Erhöhung der Nachlast, in steigenden Füllungsdrücken, diastolischer Dysfunktion und vermindertem Auswurfvolumen und endet schließlich im Rechtsherzversagen (Voelkel et al., 2006).

An diesen Ausführungen wird deutlich, dass die Funktion des rechten Herzens das entscheidende Kriterium für die Überlebenswahrscheinlichkeit des PAH-Patienten darstellt und dass es gilt, diese Funktion so gut es geht zu erhalten (Haworth, 2007).

Leider ist bisher noch wenig über zelluläre und molekulare Mechanismen bekannt, die den Umschwung von kompensatorischer Hypertrophie zu Dilatation und Herzversagen ausmachen.

Die Prävalenz für PAH liegt heute bei 15 Patienten / 1 Million (Humbert et al., 2006). Idiopathische PAH (IPAH) ist eine äußerst seltene Erkrankung mit 1-2 Neuerkrankungen pro 1 Million Einwohner pro Jahr (Reichenberger and Voswinckel, 2011). IPAH tritt vorwiegend bei Patienten zwischen 20 und 40 Jahren auf und wird häufiger bei Frauen als bei Männern diagnostiziert (1,7:1) (Nauser and Stites, 2001). Die mittlere Überlebenszeit der IPAH liegt bei 2,8 Jahren (Reichenberger and Voswinckel, 2011).

Die durchschnittliche Dauer vom Auftreten erster Symptome bis hin zur Diagnosestellung beträgt 2,8 Jahre (Badesch et al., 2010). IPAH macht 46% aller Diagnosen aus, erblich bedingte PAH 2,7% und PAH, die im Zusammenhang mit anderen systemischen Erkrankungen entsteht wird in 50% aller Fälle diagnostiziert (Badesch et al., 2010).

Leider besteht bis heute keine Aussicht auf Heilung für PAH-Patienten und die Überlebensaussichten sind immer noch schlecht. Trotz moderner medikamenteller Therapien kommt es zum Fortschreiten der Erkrankung und vielen Patienten kann im Endstadium nur noch durch eine Lungentransplantation geholfen werden.

2.4.2 Bisherige Therapiemöglichkeiten

Noch Mitte der 1990er Jahre war die PAH mit einer sehr schlechten Prognose aufgrund fehlender Therapiemöglichkeiten behaftet. Heutzutage ist diese aufgrund der Entwicklung einer pulmonal vasoaktiven Therapie schon als deutlich positiver einzustufen, jedoch bleibt die Erkrankung weiterhin im Fokus der aktuellen Forschung (Reichenberger and Voswinckel, 2011).

Die vorrangigen Ziele einer Therapie sind neben der Vermeidung der auslösenden Faktoren einer PAH, die Senkung des pulmonalarteriellen Drucks und damit die Reduktion der rechtsventrikulären Nachlast. Um dies zu erreichen stehen prinzipiell 2 Möglichkeiten zur Verfügung:

1. Aufhebung eines dauerhaft erhöhten Vasotonus durch Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (akuter Effekt von Vasodilatoren)
2. Beeinflussung des strukturellen Gefäßumbaus (vaskuläres Remodelling) durch Einsatz von antiinflammatorischen und antiproliferativen Agenzien.

Bisher sind 3 Substanzklassen zur Therapie der PAH zugelassen und werden mittlerweile standardmäßig auch in Kombination zur Behandlung eingesetzt:

- Prostanoides zur Substitution des endogenen Mangels an vasodilatativ wirkendem Prostacyclin
- Endothelinrezeptorantagonisten zur Blockade der vasokonstriktiven und mitogenen Wirkung von Endothelin
- Phosphodiesterase-5-Inhibitoren zur Prolongation der vasodilatativen Wirkung von endogenem Stickoxid (NO)

(Reichenberger and Voswinckel, 2011).

2.5 MiRNAs allgemein

MiRNAs sind eine Familie kleiner, nicht-kodierender, einzelsträngiger RNAs, die sich aus nur ca. 21-25 Nukleotiden zusammensetzen. Sie regulieren die Genexpression im überwiegenden Maße negativ auf post-transkriptionaler Ebene.

Das erste Mitglied dieser Familie, *lin-4*, wurde 1993 von den Wissenschaftlern Ambros, Lee und Feinbaum in *Caenorhabditis elegans*, einem Nematoden, entdeckt. Es war bereits bekannt, dass dieses Gen eine Rolle in der Larvenentwicklung von *C. elegans* spielt. Wie lange Zeit vermutet, kodierte es aber nicht für ein Protein, sondern produzierte stattdessen eine kleine doppelsträngige RNA, die durch komplementäre Basenpaarung in der Lage war, die Translation anderer Gene (in diesem Fall *lin-14*) zu unterdrücken (Lee et al., 1993).

Seit dieser Zeit unterliegen die miRNAs intensiver Erforschung. Bis heute wurden hunderte Mitglieder dieser Genfamilie in Insekten, Pflanzen und Säugetieren entdeckt und man fand heraus, dass sie an verschiedensten Entwicklungsprozessen und physiologischen Abläufen beteiligt sind (Bartel, 2004), (Carrington and Ambros, 2003), (He and Hannon, 2004).

MiRNAs entstehen aus großen, ca. 2kb langen Molekülen, den sogenannten *pri-miRNAs* (Lee et al., 2002), welche im Zellkern mit Hilfe der RNase III Droscha (Lee et al., 2003) und ihrem Bindungspartner Pasha (DGCR8) (Yeom et al., 2006) in haarnadelförmige *pre-miRNAs* (ca. 70 Nukleotide lang) umgewandelt werden. Diese *pre-miRNAs* werden über *exportin-5* ins Zytoplasma transportiert (Lund et al., 2004) und hier schlussendlich von der Ribonuklease Dicer in kleine ca. 22 Nukleotide lange Komplexe geschnitten (Bernstein et al., 2001). Ein Strang der so entstandenen reifen miRNA (= *active guide strand*) wird dann in den miRNA-induced-silencing-complex (miRISC) inkorporiert. In diesem Komplex findet schließlich die Interaktion zwischen der miRNA und ihren Zielgenen (mRNAs) statt, was zur Hemmung der Translation und demzufolge zu keiner Bildung von Proteinen führt. Der andere Strang (= *passenger strand*) wird abgebaut (Fabian and Sonenberg, 2012), (Zhu and Fan, 2011).

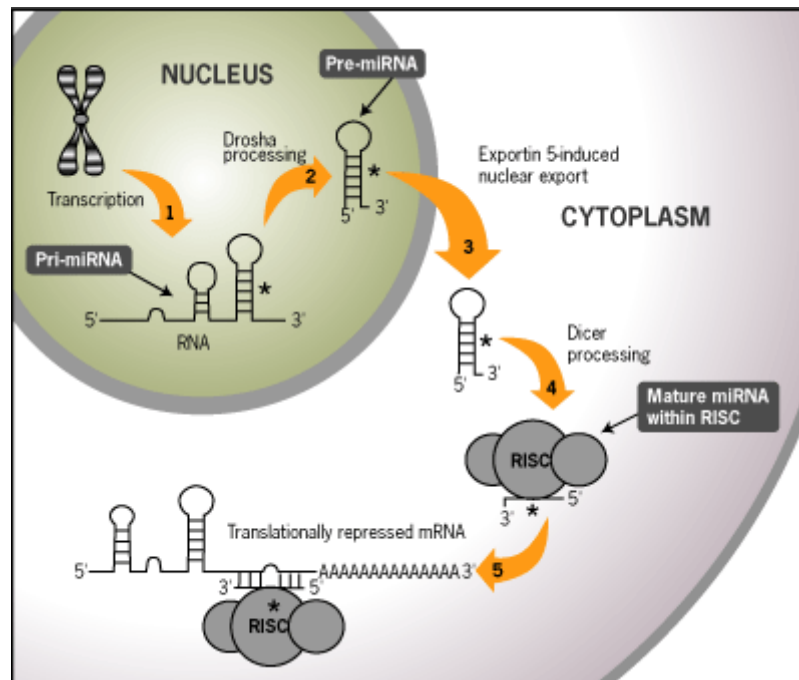


Abbildung 3: Entstehung und Wirkungsweise von miRNAs

© www.immunotrends.blogspot.com

2.6 MiRNAs im Herz

In den letzten Jahren gewannen die miRNAs insbesondere in der Herz-Kreislauf-Forschung eine immer größer werdende Bedeutung. Verschiedene Studien ergaben, dass die Fehlexpression von miRNAs eine große Rolle bei der Entstehung von Herzerkrankungen spielt. Dies ist insbesondere durch die Tatsache zu erklären, dass am Herzen sogenannte Remodelling-Prozesse, wie Muskelzellhypertrophie oder Myokardfibrose entscheidend durch miRNAs mitbeeinflusst werden.

In den letzten Jahren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen umfangreiche Screenings bezüglich der Expression unterschiedlicher miRNAs im erkrankten Herzen durchgeführt (van Rooij et al., 2006), (Sayed et al., 2007), (Cheng et al., 2007), (Prasad, 2009). Alle Studien konnten belegen, dass sich das Expressionsprofil bestimmter miRNAs im erkrankten Gewebe deutlich von dem im gesunden Gewebe unterschied. Demzufolge liegen Vermutungen nahe, dass veränderte Expressionen von miRNAs an der Entstehung von Herzerkrankungen beteiligt sind.

Ausgehend davon wird zunehmend untersucht, inwieweit spezielle, auf miRNA-Basis entwickelte Therapeutika, die Umbauprozesse am Herzen verhindern und somit die Entstehung von Herzversagen minimieren können.

Als Therapieansätze sind 2 verschiedene Strategien möglich: Wird im Zusammenhang mit bestimmten Erkrankungen eine deutliche Hochregulation einzelner miRNAs festgestellt, muss das Therapieziel sein, diese zu hemmen und zu verhindern, dass sie an ihre Ziel-mRNA binden können.

Geht die Erkrankung eher mit einer Erniedrigung spezifischer miRNAs einher, sollten diese als exogene Moleküle zugeführt werden, um die Aktivität der fehlenden miRNAs zu ersetzen (Latronico and Condorelli, 2011).

2005 entwarfen Krützfeld et al. einen pharmakologischen Ansatz, um miRNAs in vivo zu hemmen: Sie entwickelten chemisch modifizierte, cholesterol-konjugierte Einzelstrang RNA-Analoga, welche komplementär zu bestimmten miRNAs waren und gaben diesen die Bezeichnung „Antagomir“ (Krutzfeldt et al., 2005). Das Antagomir wurde intravenös verabreicht und war in der Lage, bestimmte miRNAs in unterschiedlichen Geweben, außer dem Gehirn, spezifisch zu eliminieren. Da das Zuckergerüst dieser Substanzen durch stabile Phosphothioate am 3' und 5' Ende ersetzt wurde, werden sie im Körper nicht so leicht abgebaut (Fiedler et al., 2012).

2.7 MiRNA-21

Wie bereits unter 2.6 beschrieben, wurden bezüglich des Expressionsprofils der verschiedenen miRNAs im Zusammenhang mit Herzerkrankungen bereits zahlreiche Studien durchgeführt. In allen Fällen fiel eine besonders starke Änderung im Expressionsprofil der miRNA-21 auf. In Mausmodellen für Herzhypertrophie konnten bei den erkrankten Tieren im Vergleich zur Sham-Gruppe 4-fach höhere Expressionswerte der miRNA-21 gemessen werden (Cheng et al., 2007).

Bisher ist bekannt, dass die miRNA-21 im Rahmen von Herzkreislaferkrankungen Einfluss auf die Proliferation und Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen, das Wachstum von Herzmuskelzellen und auf die Funktion und das Verhalten der Herzfibroblasten hat (Cheng and Zhang, 2010). Als Zielgene der miRNA-21 sind bisher die Proteine aus der Sprouty-Familie, insbesondere Sprouty1 und Sprouty2, identifiziert

worden (Cheng and Zhang, 2010), (Thum et al., 2008), (Sayed et al., 2008). Beide Zielgene werden bei vermehrter Expression der miRNA-21 von dieser herunterreguliert. Sprouty2 ist ein negativer Regulator für die Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen. Wird dieses Protein durch vermehrtes Vorliegen der miRNA-21 in seiner Wirkung gehemmt, kommt es zu einer verstärkten Ausbildung von Zellausläufern, die die Herzmuskelzellen miteinander verbinden (gap junctions). Solche Verbindungen sind im gesunden Herzen nur auf die Bereiche der Glanzstreifen beschränkt. Als funktionale Konsequenz ergibt sich eine beschleunigte Erregungsleitung: Normalerweise zeigen die einzelnen Zellen im Herzgewebe voneinander unabhängige Kontraktionsrhythmen. Die Ausbildung der vermehrten Zellverbindungen führt jedoch dazu, dass die Zellen synchron kontrahieren und die Erregung somit schneller weitergeleitet wird. Dieser Effekt ist im erkrankten Herzen anfangs adaptiv als Antwort auf die sich ausbildende Hypertrophie des Herzmuskels, kann jedoch in späteren Stadien zum Herzversagen durch Erschöpfung führen (Sayed et al., 2008).

Sprouty1 nimmt über die Hemmung der miRNA-21 Einfluss auf die Herzfibroblasten und verhindert die Ausbildung von Fibrose (Thum et al., 2008). Das Vorliegen vermehrter fibrotischer Bezirke im Herzmuskelgewebe führt zu Einschränkungen in der Herzfunktion, einerseits durch eine verminderte Elastizität des Gewebes und damit einhergehender verminderter Kontraktions- und Entspannungsfähigkeit; andererseits durch eine verlangsamte Erregungsleitung.

Die Mitglieder der Sprouty-Protein-Familie wirken als Negativregulatoren des durch verschiedene Wachstumsfaktoren beeinflussten MAPK-Signalweges. Dieser Signalweg läuft folgendermaßen ab:

Als Rezeptoren fungieren Rezeptortyrosinkinasen, die in der Lage sind, am Rezeptor gebundene Adaptermoleküle (in diesem Fall Grb2) zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Im Zusammenspiel mit einem weiteren Adapterprotein (Sos1) kann an der GTPase Ras der Austausch von GDP zu GTP erfolgen. Sobald Ras GTP gebunden hat, ist es in der Lage, die Proteinkinase Raf (=MAPK-kinase-kinase) zu stimulieren. Raf aktiviert daraufhin MEK (=MAPK/ERK-Kinase), welche schlussendlich das Signal auf ERK1/2 überleitet, woraufhin verschiedene Transkriptionsfaktoren in der Zelle beeinflusst werden (Li et al., 2003).

Bei Bindung von Wachstumsfaktoren an die entsprechenden Rezeptoren wird nicht nur der gekoppelte Signalweg in Gang gesetzt, sondern immer auch gleichzeitig die Expression von Sproutyproteinen induziert. Diese konzentrieren sich dann vor allem an der Zellmembran, dem Ort, wo die MAPK-Hemmung erfolgt (Cabrita and Christofori, 2008).

Je nach Wachstumsfaktorrezeptor greift Sprouty an unterschiedlichen Stellen in den Signalweg ein und bewirkt dadurch die Hemmung von ERK (Cabrita and Christofori, 2008):

a) FGF-Rezeptor

Bei Bindung von FGF an den entsprechenden Rezeptor ist Sprouty in der Lage, Grb2, Sos1 oder Raf1 zu hemmen. Der Signalweg wird bereits unterbrochen, bevor die MAPK aktiviert werden kann.

b) VEGF-Rezeptor

Dieser Signalweg läuft Ras-unabhängig ab. Bei Bindung von VEGF an den Rezeptor wird die Phospholipase C aktiviert, welche mithilfe der Proteinkinase C Raf aktiviert. Hierbei übt Sprouty eine hemmende Funktion auf Raf aus.

c) EGF-Rezeptor

Dieser Signalweg wird von den Sproutyproteinen nicht gehemmt.

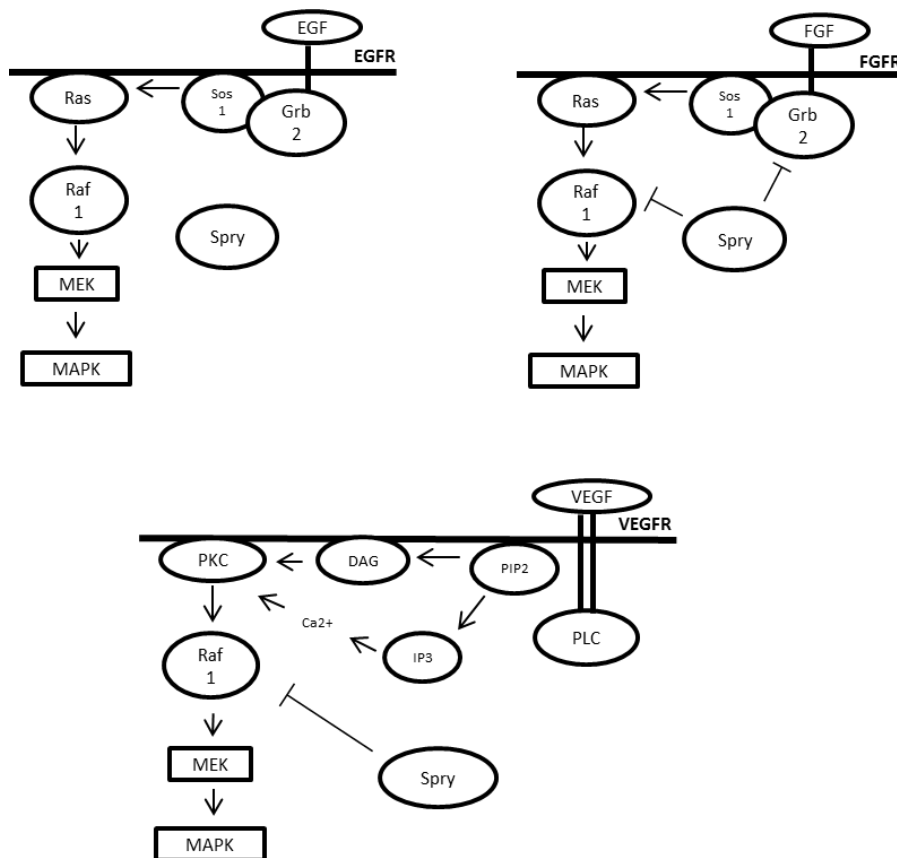


Abbildung 4: Wirkungsweise von Sprouty in den verschiedenen Wachstumsfaktor-Signalwegen (modifiziert nach Cabrita and Christofori, 2008)

Ein weiterer Wachstumsfaktor, der Einfluss auf die miRNA-21 hat, ist TGF- β .

Bei Bindung von TGF- β an den entsprechenden Rezeptor kommt es zur Aktivierung von rezeptorregulierten Smad-Proteinen (Smad2 und Smad3). Sobald diese phosphoryliert sind, können sie sich vom Rezeptor lösen und einen heteromeren Komplex mit Smad4 (Co-Faktor-Smad) bilden. Dieser Komplex ist nun in der Lage, in den Zellkern einzudringen und die Transkription verschiedener Gene zu beeinflussen.

Desweiteren ist TGF- β auch in der Lage, Smad-unabhängig Signalwege zu beeinflussen. Hierzu gehört beispielsweise der MEK/ERK-Signalweg (Yoshimatsu and Watabe, 2011).

TGF- β führt zu einer erhöhten Expression der miRNA-21 auf posttranskriptionaler Ebene: Nach Stimulation des TGF- β -Rezeptors sind die rezeptorgebundenen Smads in der Lage, einen Komplex mit der RNA-Helicase p68 zu bilden, einer Komponente des

Enzyms Drosha. Die RNase Drosha ist in den Entstehungsprozess der miRNAs involviert: Sie bewirkt die Umwandlung von pri- in pre-miRNAs. Auf diesem Wege kann TGF- β den Entstehungs- und Reifungsprozess der miRNA-21 beschleunigen (Davis et al., 2008).

Darüber hinaus ist TGF- β maßgeblich an der Entstehung von Myokardfibrose beteiligt. Dieser pathologischen Veränderung liegt insbesondere der Mechanismus der Endothelial-Mesenchymalen-Transition zugrunde. Hierbei werden Zellen, die eigentlich endothelialen Ursprungs sind, in mesenchymale Zellen transformiert und tragen somit zur Akkumulation der Herzfibroblasten bei. Unter normalen Bedingungen findet man den Mechanismus der Endothelial-Mesenchymalen-Transition nur in der Embryonalentwicklung des Herzens, jedoch nicht in adulten Zellen (Zeisberg et al., 2007).

2.8 Untersuchungen zur miRNA-21 in Bezug auf Linksherzinsuffizienz

Die Expression von miRNA-21 wird bei Herzversagen deutlich induziert, insbesondere in Fibroblasten. Thum et al. konnten 2008 im Mausmodell zeigen, dass miRNA-21 die ERK-MAPK-Signalkaskade in Herzfibroblasten reguliert: miRNA-21 hemmt Sprouty1, einen potenten Inhibitor der ERK-MAPK-Signalkaskade. Dieses führt dazu, dass der ERK-MAPK-Signalweg aktiviert wird und es zu Proliferation und verminderter Apoptose von Fibroblasten kommt. Somit ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der Herzfibroblasten deutlich gesteigert, was zu verstärkter Herzfibrose und Remodellingprozessen im Herz führt. Dieses ergibt schlussendlich das charakteristische Bild des Herzversagens. Der Einsatz eines spezifischen Antagomirs zur Hemmung der miRNA-21 führte zu der Erkenntnis, dass strukturelle und funktionelle Veränderungen für Herzversagen verhindert und sogar geheilt werden können. Mit Antagomir-21 behandelte Tiere wiesen eine signifikante Verbesserung der Herzfunktion auf, die mit einer Regression in Hypertrophie und Fibrose einherging (Thum et al., 2008).

Arbeitsgruppen der Universität Texas publizierten 2010 kontroverse Ergebnisse bezüglich des Einflusses von miRNA-21 auf Herzerkrankungen:

Innerhalb ihrer Untersuchungen präsentierten sich miRNA-21-knock-out-Mäuse als normal und zeigten, wenn sie unterschiedlichen Arten von Stress ausgesetzt wurden, trotz des Knock-outs Herzhypertrophie, -fibrose und Kontraktilitätsverminderung –

Reaktionen, die vergleichbar waren mit denen, die Wildtypmäuse zeigten. Ähnliche Untersuchungen wurden auch mit Antagomiren durchgeführt, um die miRNA-21 zu hemmen. Auch unter diesen Bedingungen konnten keine Verbesserungen der Herzfunktion bzw. eine Verhinderung der Remodellingprozesse festgestellt werden. Hieraus wurde geschlossen, dass die miRNA-21 das pathologische cardiac-remodelling nicht beeinflusst (Patrick et al., 2010).

Unterschiede zwischen beiden Studien:

Während Thum et al. für die Inhibition der miRNA-21 hochspezifische 22- und 15-Nukleotide lange anti-miRNA-21-Oligonukleotide (Antagomir) benutzten, verwendeten Patrick et al. 8-Nukleotide lange anti-miRNA-21-Oligonukleotide. Das 22-Nukleotide-lange Antagomir war komplementär zur gesamten Länge der miRNA-21, während das 8-Nukleotide-lange Antagomir nur komplementär zu Nukleotid 2-9 der miRNA-21 war.

Thum et al. benutzten als Kontrollsubstanz lediglich PBS, während Patrick et al. zusätzlich noch Kontrollgruppen hatten, denen ein Antagomir mit veränderter Basensequenz verabreicht wurde.

Thum et al. benutzten ein Cholesterol-konjugiertes Antagomir, welches intravenös über die Vena jugularis verabreicht wurde. Im Gegensatz dazu verwendeten Patrick et al. ein unkonjugiertes LNA-modifiziertes Antagomir-21, welches über die Schwanzvene appliziert wurde.

Hier besteht die Möglichkeit, dass die Cholesterol-Konjugation kardioprotektiv wirkt, bzw. dass diese Antagomire zumindest die miRNA-21- Funktion in den Fibroblasten effektiver hemmen als die LNA-modifizierten Antagomire (Patrick et al., 2010).

2.9 Ziel der Arbeit

Im Allgemeinen liegen über pathologische Veränderungen im linken Herzen schon deutlich detailliertere Erkenntnisse vor, als dieses bei Erkrankungen des rechten Herzens der Fall ist. Daher soll das rechte Herz im Rahmen dieser Doktorarbeit in den Fokus gerückt werden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung der miRNA-21 und deren Beteiligung an der Entstehung primärer und sekundärer rechtsventrikulärer Erkrankungen. Hierbei können die bereits gewonnenen Erkenntnisse und

durchgeführten Experimente zum Linksherzversagen/Linksherzinsuffizienz in gewissem Maße als Anhaltspunkt dienen, jedoch müssen die bestehenden deutlichen Unterschiede zwischen linkem und rechtem Herzen berücksichtigt werden.

Ziel dieser Arbeit soll sein, neuartige Mechanismen, die an der Entstehung von rechtsventrikulärer Hypertrophie und Fibrose beteiligt sind, aufzudecken und ausgehend davon, Grundlagen für neuartige Therapiemöglichkeiten aufzuzeigen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Wildtypmäuse (*Mus musculus*) der Inzuchtlinie C57Bl/6N verwendet. Diese Mäuse wurden 1921 von C.C. Little entwickelt und werden heute für verschiedenste Experimente in der Forschung eingesetzt. Zuchtbetrieb und Lieferant dieser Tiere war Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland.

Die Mäuse wurden in einem Alter von ca. 12 Wochen geliefert, was einem Körpergewicht zwischen 20 und 23g entspricht.

Für den Zeitraum der Versuche wurden die Tiere im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen gehalten. Im Tierstall wurde offene Käfighaltung im offenen Regalsystem praktiziert, d.h. die Tiere wurden in einem offenen, mit Gitterdeckel verschlossenen Käfig gehalten. Wann immer möglich, wurden die Mäuse in Gruppen à 5 Tiere in Makrolonkäfigen vom Typ II lang (Grundfläche 540cm²) gehalten. Die Käfige waren mit Holzspänen eingestreut. Als Enrichment standen in jedem Käfig ein rotes Plastikhäuschen mit 2 Eingängen sowie Zellstoff oder Papierhandtücher als Nistmaterial zur Verfügung.

Die Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu Leitungswasser, welches in Nippeltränken angeboten wurde. Gefüttert wurden die Tiere ad libitum mit Altromin 1324 Haltungsdiät für Nager von der Firma Altromin.

Um mit Hilfe des Lichtregimes einen Tag-Nacht-Rhythmus zu erreichen, wurden die Mäuse tagsüber für 12 Stunden bei normaler Beleuchtung gehalten, in den Abend- und Nachtstunden konnte im gesamten Tierstall nur Rotlicht eingeschaltet werden.

Die Umgebungstemperatur betrug im Mittel 24°C.

3.1.2 Tierversuchsgenehmigung

Die durchgeführten Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt und können unter dem Aktenzeichen B2/267 eingesehen werden.

3.1.2 Injektionslösungen und Substanzen

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Injektionslösungen und Substanzen

Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Vetergesic® Injektionslösung 0,3mg/ml (Buprenorphin)	CEVA Tiergesundheit, Düsseldorf
Isotone Natrium-Chlorid-Lösung 0,9%	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Glucose-Infusionslösung Glucosteril® 5%	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H.
Haut-Desinfektionsmittel Cutasept®	Bode Haut-Desinfiziens Chemie, Hamburg
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Health Care, Leverkusen
Rimadyl® Injektionslösung 50mg/ml (Carprofen)	Pfizer, Berlin
Antagomir21	S. Dimmeler, JWG Universität Frankfurt
Co-Antagomir	S. Dimmeler, JWG Universität Frankfurt
Co4+A-Antagomir	S. Dimmeler, JWG Universität Frankfurt
Natrium-Chlorid 58,44g/mol	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Kalium-Chlorid 74,56g/mol	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat 141,96g/mol	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat 136,09g/mol	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Xylol	VWR International S.A.S., Fontenay-sous- Bois, Frankreich
Ethanol 99,6%, 96% und 70%	J.T.Baker, Altmann Analytik GmbH & Co. KG, München

Destilliertes Wasser	Thermo Scientific, Rockford, USA
Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken
Siriusrot	Niepötter Labortechnik, Bürstadt
Essigsäure 1mol/l	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Pikrinsäure Lösung 1,2%	AppliChem GmbH, Darmstadt
BSA (Bovine Serum Albumin)	PAA Laboratories GmbH; Pasching, Österreich
Lectin, FITC-labeled	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DAPI Nucleic Acid Stain	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako, Glostrup, Denmark
Entellan Schnelleindeckelmedium	Merck KGaA, Darmstadt
Ultraschallkontaktgel, Aquagel®	Parker Laboratories Inc., Fairfield, USA
Radioimmunoprecipitation assay (RIPA)- Puffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
EDTA Solution 0,5M	Thermo Scientific, Rockford, USA
Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific, Rockford, USA
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	PAN Biotech GmbH
Tetramethylethylendiamine	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat 10%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris Base	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Tris Säure	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe

SDS Pellets	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Milchpulver	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, München
Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
Kaleidoskop Marker	BioRad Laboratories GmbH, München
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, USA

3.1.3 Antikörper

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper

ERK 1/2 – Antikörper sc-93 aus Kaninchen 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
p-ERK 1/2 - Antikörper sc-16982-R aus Kaninchen 1:600	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Sprouty1 – Antikörper sc-30048 aus Kaninchen 1:600	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
GAPDH 1:5000	Novus Biologicals, Cambridge, UK
Anti-Kaninchen-Peroxidase (hergestellt in Ziege) 1:2000	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti-Maus-Peroxidase (hergestellt in Kaninchen) 1:2500	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Einmalspritze 1ml Luer Omnifix®-F	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanülen, Hyperdermic Needles Luer Lock, verschiedene Größen	Henry Schein, Melville, USA
Vasofix® Braunüle 20G	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Weck Ligaturclips Hemoclip®	RICA Surgical Products, Inc., Illinois, USA
Nadel-Faden-Kombination, Vicryl Plus 5-0	Ethicon, Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Seidenfäden	
Zellstofftupfer, Purzellin®	Lohmann und Rauscher, Regensburg
Fixierpflaster 5m x 2,5cm, Leukosilk®	BSN medical GmbH&Co KG, Hamburg
Falcon Röhrchen, BD Falcon® Konisches Röhrchen 15ml, 50ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Schlinggazetupfer, unsteril, 20x20cm	Fuhrmann GmbH, Much
S-Monovette® Lithium-Heparin	Sarstedt AG und Co, Nümbrecht
Eppendorf-Tubes 1,5ml	Sarstedt AG und Co, Nümbrecht
Objektträger, 25x75x1mm, Super Frost Ultra Plus®	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
Deckgläschen, 24x36mm	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
Histologie-Einbettkassetten Rotilabo®	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Objektträgerküvette Plastik	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Färbekasten mit Falzdeckel	Hecht Assistent, Sondheim/Rhön
Färberahmen für 10 Objektträger	Hecht Assistent, Sondheim/Rhön

PAP Pen	Kisker Biotech GmbH und Co. KG, Steinfurt
Mikrotomklingen	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Paraffin-Einbettmedium Paraplast Plus ®	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Einmalhandschuhe Micro Touch® Nitra Tex®	Ansell LTD, Tamworth, Staffordshire, UK
Edelstahl-Einbettform	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Pipettenspitzen 1000µl, 200µl, 20µl	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
Einmalpipetten Cellstar®, verschiedene Größen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Precellys Ceramic Kit 1,4mm 2ml tube	Peqlab, Erlangen
Pierce ® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Färbekammer	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Whatman Blotting Papier	Biorad, München
Blottingmembran	Biorad, München
Cellstar® 96 well Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
ELISA Kit für NT-proBNP	Uscnk Life Science Inc., Wuhan, China
TaqMan®Small RNA assay # 4366597	Life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Taqman Fast Universal Master Mix #4367846	Life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
miRNEasy Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande

3.1.5 Geräte

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Geräte

Narkosekasten, Durchsichtiger Plexiglaskasten	Eigenbau
Isofluran-Verdampfer Dräger-Vapor 2000	Drägerwerk AG und Co. KGaA, Lübeck
Beatmungsgerät Mini Vent Type 845	Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten
OP-Mikroskop (Lupe) Leica MS 5	Leica GmbH, Wetzlar
Kalte Lichtquelle mit 2 Armen, Schwanenhalslampe	Schott AG, Mainz
Wärmebett (Wasserbett mit Korkmatte)	Eigenbau
Warmwasserbereiter Lauda Ecoline Staredition	Lauda GmbH und Co. KG, Lauda- Königshofen
Schermaschine Contura®	Wella, Darmstadt
Handstaubsauger Philips 4.8V Wet & Dry	Philips Deutschland GmbH, Hamburg
Intubationsvorrichtung	Eigenbau
Millar® Katheter Mikro-Tip Catheter Transducers	Millar Instruments Inc.; Houston Texas, USA
Millar® Pressure Control Unit	Millar Instruments Inc.; Houston Texas, USA
Powerlab	AD Instruments GmbH Germany, Spechbach
EKG-Elektroden	AD Instruments GmbH Germany, Spechbach
Computer mit Monitor	Dell GmbH, Frankfurt am Main
Chart ® Software	

Thermosonde Tcat-2LV	Physitemp Instruments, Inc.; Clifton, New Jersey
Analysenwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen- Frommern
Rotationsmikrotom	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Paraffinausgießstation/Einbettungsmaschine	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Kühlplatte	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Entwässerungsmaschine	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Paraffinstreckbad	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Wärmeplatte zum Trocknen	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Leica Q Win V3 Software	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Elektrische Schieblehre	
Zentrifuge Mikro200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Westernblottingsystem	BioRad, München
Precellys 24	Peqlab, Erlangen
ELISA Reader infinite M200pro	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Westernblotentwicklermaschine	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Westernblot Entwicklungssoftware ChemoStar	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Image J Software	
Vortexer	Scientific Instruments GmbH, Berlin
Homogenisator Fastprep®	MP Biomedicals, Illkirch Cedex, Frankreich
Waage EBM 1000-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen- Frommern

Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen
Pipetten verschiedene Größen	Research Plus Eppendorf, Hamburg
Multikanalpipette	Research Plus Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop/Fluoreszenzmikroskop mit Kamera	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Echokardiographie-Gerät Vevo770	Visual Sonics, Toronto, Canada

1.6 Operationsbesteck

Tabelle 5: Übersicht über das verwendete Operationsbesteck

Kleine spitze gerade Schere, 9cm FST® 14958-09	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Kleine gerade anatomische Pinzette FST® 11040-08	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Kleine gebogene anatomische Pinzette FST® 11041-08	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Wundhaken	Eigenbau
Nadelhalter, 14cm FST® 1265-14	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Anatomische gebogene Pinzette FST® 11009-13	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Zahnarztbesteck (2 kleine Haken)	Eigenbau
Zange für Hemoclips® Weck 523/40S	RICA Surgical Products, Inc., Illinois, USA

3.1.7 Puffer

PBS 1fach

- 137 mM NaCl
- 2,7mM KCl
- 10,0 mM Na₂HPO₄
- 1,8mM KH₂PO₄

TBST 1fach

- 0,05% Tween20
- 20mM Tris Base
- 150mM NaCl

Transfer-Puffer

- 20% Methanol
- 19mM TrisHCl
- 190mM Glycin

Laufpuffer

- 25mM TrisHCl
- 192 mM Glycin
- 0,1% SDS

10% BSA-Blocking Puffer Histologie

- 1fach PBS
- 2nM NaN₃
- BSA

3.2 Methoden

3.2.1 Pulmonary Artery Banding (PAB)-Modell

Pulmonary Artery Banding (PAB) ist ein Modell für rechtsventrikuläre Hypertrophie. Es wurde ein Titanium-Clip verwendet, mit dem der Durchmesser der Pulmonalarterie auf ca. 0,3mm verengt wurde, so dass das Herz dauerhaft gegen einen erhöhten Widerstand anpumpen muss.



Abbildung 5: schematische Darstellung des PAB

©<http://www.yale.edu>

3.2.1.1 Durchführung der Operation

Die Operation wurde als Thorakotomie durchgeführt. Um die Entstehung eines Pneumothorax zu verhindern, wurden die Mäuse vor Beginn der Operation intubiert und an ein Beatmungsgerät angeschlossen. Zur Intubation wurde das vordere flexible Ende einer 20G Braunüle verwendet, welches mithilfe der Führungsschiene zwischen den Stimmritzen hindurch ca. 1 cm weit in die Trachea geschoben wurde. Das obere freie Ende des Tubus wurde an das Beatmungsgerät angeschlossen.

Die Narkose wurde mit 2% Isofluran (gemischt mit Sauerstoff und Raumluft) aufrechterhalten, wobei die Beatmungsfrequenz 200-250 Atemzüge/Minute bei einem Volumen von 220µl/Atemzug betrug. Um ein Kollabieren der Alveolen während der maschinellen Expiration zu verhindern, wurde ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von ca. 1 cm Wassersäule eingestellt.

Zur Analgesie bekam jede Maus vor der Operation 0,3mg/kg Buprenorphin (Vetalgescic®) s.c. verabreicht.

Die Operation wurde unter dem Mikroskop bei einer Vergrößerung von 1,6 durchgeführt.

Die Maus wurde auf der rechten Körperseite gelagert und fixiert.

Vom Sternum bis zur Axilla wurde auf der linken Thoraxseite eine ca. 2cm x 2cm große Stelle freirasiert und desinfiziert.

Nach Überprüfung der Narkosetiefe mithilfe des Reflextestes wurde die desinfizierte Haut etwa in der Mitte einer gedachten Linie zwischen Sternum und Achselhöhle auf einer Länge von ca. 1,5cm durchtrennt. Nach cranial und caudal wurde ausgehend vom Hautschnitt die Haut stumpf vom darunterliegenden Gewebe getrennt und mit den Wundhaken zur Seite gespannt.

Die darunterliegende Pectoralmuskulatur wurde ebenfalls stumpf getrennt und zur Seite gespannt.

Zwischen erster und zweiter Rippe wurde die Interkostalmuskulatur stumpf durchtrennt und im Rippenverlauf ca. 1cm weit geöffnet, um Zugang zur Brusthöhle zu bekommen.

Das Perikard wurde eröffnet, Herzohr und Thymus vorsichtig beiseitegeschoben und die Pulmonalarterie leicht vorgelagert. Das Bindegewebe, welches die Pulmonalarterie mit der Aorta und dem umgebenden Gewebe verbindet, wurde so weit entfernt, bis es möglich war, mithilfe einer dafür vorgesehenen Zange, den Hämoclip um die Pulmonalarterie zu legen. Der Clip wurde bis zu einem durch die Zange vorgegebenen Durchmesser verschlossen.

Die Brusthöhle wurde verschlossen, indem die 1. und 2. Rippe mit einem Einzelheft (5-0 Vicryl Nadel-Faden-Kombination, resorbierbar) adaptiert wurden. Die Thoraxmuskeln wurden an ihren ursprünglichen Platz zurückgeschoben und die Haut mit derselben Nadel-Faden-Kombination mittels einer Kürschnernaht vernäht.

Nach Abschluss der Operation wurde das Isofluran abgestellt. Die Maus wurde weiter mit Sauerstoff/Raumluft-Gemisch beatmet, bis die eigenständige Atmung wieder einsetzte. Sobald der Schluckreflex einsetzte, konnte die Maus extubiert werden. Um etwaige Blutverluste intra op auszugleichen, wurden der Maus 0,5ml Glucose 5% s.c. verabreicht.

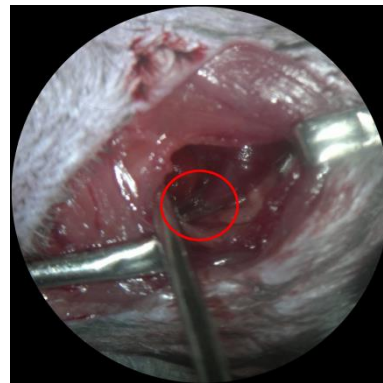
Zur intensiven Überwachung während der weiteren Aufwachphase, wurde die Maus im Käfig unter Rotlicht platziert um die physiologische Körpertemperatur schnellstmöglich wieder herzustellen. Am Ende des Tages wurden die Mäuse zurück in den Tierstall gebracht und anschließend täglich auf ihren Gesundheitszustand und den Zustand der Operationswunde kontrolliert.



Abbildung 6: Thorakotomie bei der Maus im Verlauf der PAB-OP



a)



b)

Abbildung 7: Titanclip a) im Größenvergleich, b) intraoperativ um A. pulmonalis gelegt ©Yves Schymura

3.2.2 Behandlung/Medikamentöse Intervention

3.2.2.1 Verwendete Substanzen

Bei der zu untersuchenden Substanz handelt es sich um Antagomir.

Antagomire sind eine Klasse von Oligonukleotiden, die genutzt werden, um zelleigene miRNA-Moleküle zu hemmen. Das Antagomir weist eine eindeutige Komplementarität zu einer bestimmten Ziel-miRNA auf, so dass es diese im besten Fall selektiv binden kann. Der genaue Wirkmechanismus ist zurzeit allerdings noch nicht hinreichend geklärt (Krutzfeldt et al., 2007).

In dieser Studie wurde sich auf die Untersuchung der Wirksamkeit von Antagomir-21 und der damit einhergehenden Hemmung der miRNA-21 konzentriert.

Neben dem spezifischen Antagomir-21 wurden zwei verschiedene Kontrollantagomire verwendet, die jeweils eine unterschiedlich abweichende Reihung der Oligonukleotide aufwiesen:

Antagomir-21: 5' - TCA ACA TCA GTC TGA TAA GCT A – 3'

Co-Antagomir: 5' - AAG GCA AGC TGA CCC TGA AGT T – 3'

Co4+A-Antagomir: 5' – ATT CGA CGC GGA ATA CTT CGA T – 3'

Alle Antagomire waren entsprechend der Länge der miRNA-21 22 Nukleotide lang.

Die Antagomire wurden an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität in Frankfurt/Main unter Frau Prof. S. Dimmeler hergestellt und als Pulver-Substanz geliefert. Es standen 10mg Antagomir aliquotiert in 5 Tubes à 2mg zur Verfügung.

2mg des Antagomirs wurden in 1ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst und von dieser Lösung wurden pro Injektion 0,1ml intravenös (i.v.) verabreicht. Somit wurde eine Dosis von 8mg pro kg jeden 3. Tag injiziert. Insgesamt erhielt jede Maus 3 Injektionen.

Zur Durchführung der Behandlung wurden die operierten Tiere randomisiert in 4 verschiedene Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1:

Diese Gruppe diente als Kontrollgruppe und bekam jeden 3. Tag 0,1ml PBS i.v. verabreicht.

Gruppe 2:

Diese Gruppe erhielt das spezifische Antagomir-21, ebenfalls jeden 3. Tag als i.v.-Injektion

Gruppe 3:

Diese Gruppe diente als Antagomir-Kontroll-Gruppe und bekam i.v. jeden 3. Tag Co-Antagomir verabreicht.

Gruppe 4:

Diese Gruppe stellte die zweite Antagomir-Kontroll-Gruppe dar und bekam jeden 3. Tag i.v. das Co4+A-Antagomir verabreicht.

Gruppe 5:

In dieser Gruppe befanden sich die Sham-Tiere, welche ebenfalls der Thorakotomie, jedoch ohne Einsetzen des Clips, unterzogen wurden. Diese Tiere wurden als gesunde Kontrollgruppe verwendet, ihnen wurde keines der oben angeführten Medikamente verabreicht.

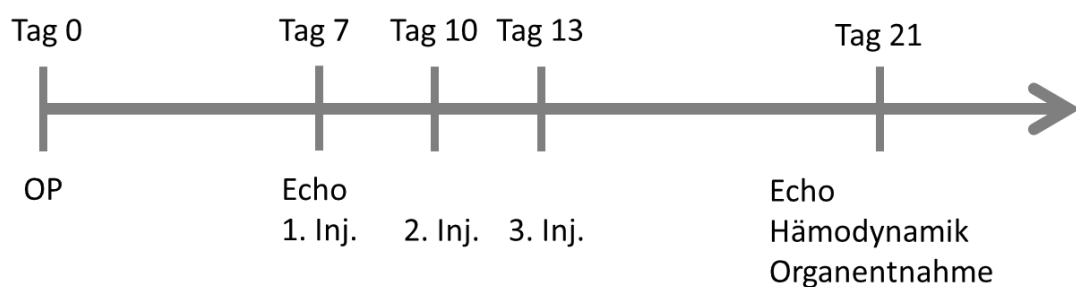


Abbildung 8: zeitlicher Ablauf des Experiments
(Inj.-Injektion, Echo-Echokardiographie)

3.2.2.2 Intravenöse Injektion in die Schwanzvene

Zur intravenösen Applikation der Antagomire und der Kontrollsubstanz (PBS) wurde bei der Maus die laterale Schwanzvene verwendet.

Vor der Injektion musste der Schwanz in einem ca. 38°C warmen Wasserbad erwärmt werden, damit sich die laterale Schwanzvene weitete und gut sichtbar wurde.

Die Substanz hatte ein Injektionsvolumen von 100µl und wurde mit einer 30G Kanüle appliziert.

3.2.3 Echokardiographie

3.2.3.1 Echokardiographie allgemein

Die Echokardiographie stellt ein nicht-invasives bildgebendes Untersuchungsverfahren des Herzens mittels Ultraschallwellen dar.

In der durchgeführten Studie wurde das Verfahren der transthorakalen Echokardiographie benutzt, d.h. der Schallkopf wird auf den Brustkorb, parasternal aufgesetzt.

Zur Untersuchung werden verschiedene Verfahren benutzt:

Im sogenannten 2D-Mode (einfache Schnittbilddarstellung) kann je nach Position des Schallkopfes das Herz in langer oder in kurzer Achse dargestellt werden.

Im Längsachsenschnitt können beide Ventrikel, das Septum, der linke Vorhof, sowie die Mitralklappe beurteilt werden. Durch Drehung des Schallkopfes um 90° kann das Herz im Querschnitt dargestellt werden. Hier können die Herzstrukturen auf 3 verschiedenen Ebenen (Aortenklappenebene, Mitralklappenebene und Ventrikelebene) untersucht werden. Generell können im 2D-Bild die Größen der Ventrikel beurteilt und Aussagen über die Klappenfunktion sowie die Pumpfunktion des Herzens getroffen werden.

Im M-Mode-Verfahren (m=motion) wird ein bestimmtes Ultraschallsignal in seiner Veränderung über einer Zeitachse aufgezeichnet. Somit können Klappenfunktionen und einzelne Zeitintervalle der Herzfunktion genau erfasst werden. Mithilfe dieses Verfahrens ist es dann auch möglich, Wanddicken und Durchmesser der Ventrikel in Systole und Diastole genau auszumessen.

Das Doppler-Verfahren wird benutzt, um Blutflüsse in Arterien und Venen darzustellen. Somit können Durchblutungsstörungen und Funktionsstörungen von Herzklappen oder Defekte im Herzmuskel beurteilt werden.

Des Weiteren ist es möglich, im Herz sowie in den großen Gefäßen Drücke und Volumina zu messen und mit Hilfe dieser Werte weitere Parameter rechnerisch zu bestimmen.

3.2.3.2 Durchführung

Im Rahmen dieser Studie wurde eine echokardiographische Messung zu 2 unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt:

Die erste Messung erfolgte an Tag 7, eine Woche nach der durchgeführten PAB-Operation. Eine weitere Messung zur Erstellung von Vergleichsaufnahmen wurde an Tag 21 durchgeführt, nach Abschluss der Behandlungsphase.

Vor Beginn der Echokardiographie wurde an beiden Zeitpunkten das Körpergewicht der Mäuse ermittelt.

Um eine repräsentative Messung durchführen zu können, musste die Maus zunächst narkotisiert werden. Für die Untersuchung wurde die Maus in Rückenlage fixiert. Das Narkosegas zur Erhaltung (2% Isofluran gemischt mit Sauerstoff) wurde ab diesem Zeitpunkt bis zum Abschluss der Echokardiographie über eine Beatmungsmaske zugeführt. Des Weiteren wurde die Maus an EKG-Elektroden angeschlossen, um kontinuierlich die Herzfrequenz und das EKG beurteilen zu können.

Zur Vorbereitung der Echokardiographie-Aufnahmen wurde das Fell auf dem Brustkorb der Maus entfernt und angewärmtes Ultraschallkontaktgel aufgetragen.

Mittels Ultraschallgerät und 25 MHz Schallkopf konnten nun die echokardiographischen Daten erhoben werden. Es wurden zweidimensionale Aufnahmen im M-Mode und mit Dopplertechnik erstellt.

Die Einteilung der Tiergruppen erfolgte randomisiert. Das heißt, die operierten Tiere wurden im Rahmen der ersten Ultraschalluntersuchung in einer zufällig gewählten Reihenfolge ihren Ursprungskäfigen entnommen, der echokardiographischen Messung unterzogen und in die jeweiligen Behandlungsgruppen verteilt.

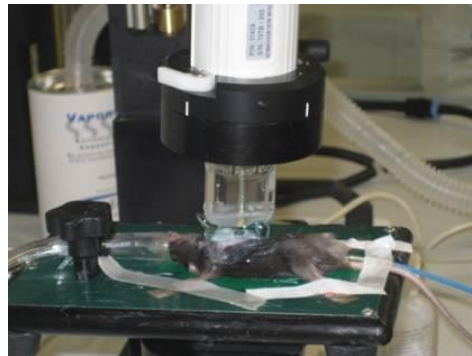


Abbildung 9: zur echokardiographischen Untersuchung vorbereitete Maus
©Baktybek Kojonazarov

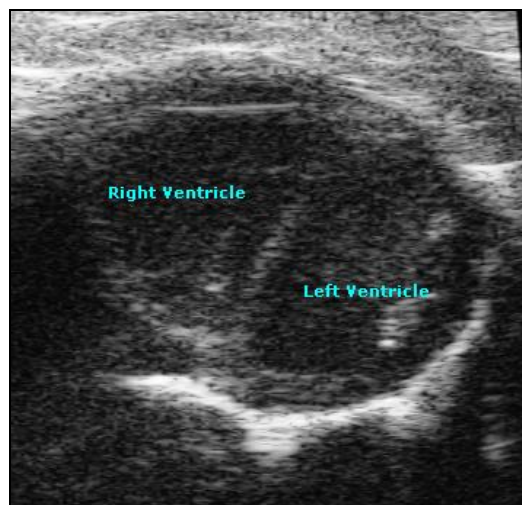


Abbildung 10: Short axis view: Dilatation des rechten Ventrikels
©Baktybek Kojonazarov

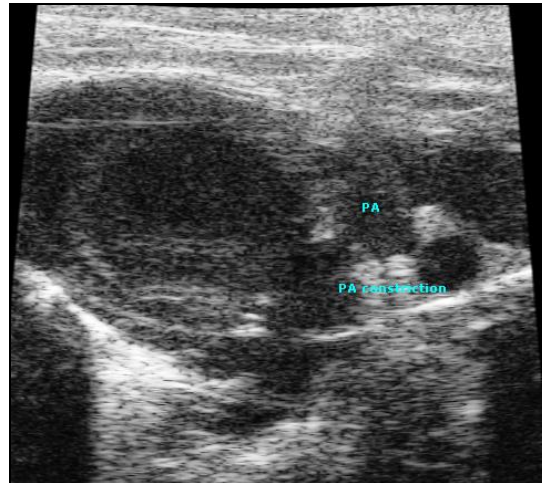


Abbildung 11: Längsachsenansicht: Konstriktion der Pulmonalarterie durch den Titanclip
©Baktybek Kojonazarov

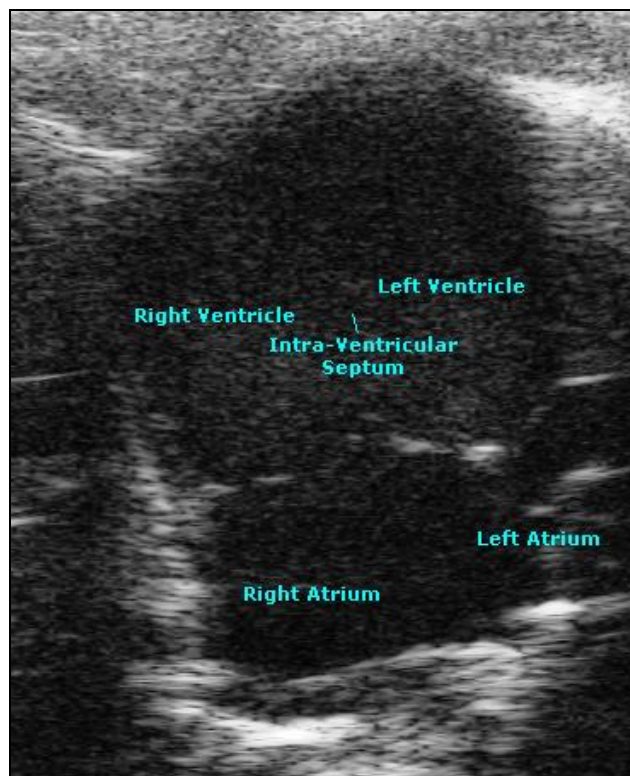


Abbildung 12: 4-Kammer-Blick
©Baktybek Kojonazarov

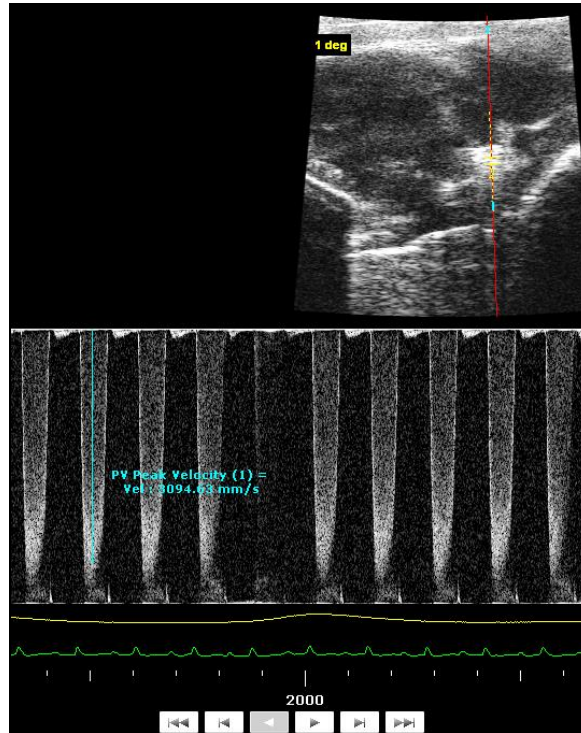


Abbildung 13: Messung des Druckgradienten über der Pulmonalarterienkonstriktion

©Baktybek Kojonazarov

3.2.3.3 Messparameter

Im Rahmen der echokardiographischen Untersuchung wurden folgende Messparameter erhoben:

- Rechtsventrikulärer innerer Durchmesser (RVID)

RVID wird definiert als die maximale Distanz zwischen freier Wand des rechten Ventrikels und Septum. Dieser Wert liefert Hinweise auf den Grad der Dilatation des rechten Ventrikels.

- Trikuspid Annular Plane Systolic Excursion (TAPSE)

TAPSE entspricht der Distanz der Bewegung des Trikuspidalanulus von der Enddiastole bis zur Endsystole und lässt damit Rückschlüsse auf die Kontraktionsfähigkeit des rechten Ventrikels zu.

- Cardiac Output (CO)/Herzzeitvolumen (HZV)

Das HZV ist das Volumen des Blutes, welches innerhalb einer bestimmten Zeit (meistens 1 Minute (Herzminutenvolumen)) über die Aorta in den Körperkreislauf gepumpt wird.

Dieser Wert wird mithilfe gemessener Werte nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Herzfrequenz (HF)} \times \text{Schlagvolumen}$$

Das Schlagvolumen wird als Produkt aus dem Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstraktes und dem Integral der systolischen Strömungsgeschwindigkeit innerhalb der Aorta (Velocity Time Integral) berechnet.

Das CO ist der wichtigste Parameter, um Aussagen über die Pumpfunktion des Herzens treffen zu können. Wird das CO auf das Körpergewicht bezogen, lässt sich der Herzindex (HI) berechnen.

- Myocardial performance Index (MPI)/Tei-Index

Der Tei-Index ist definiert als die Summe der isovolumetrischen Kontraktionszeit (IVCT) und der isovolumetrischen Relaxationszeit (IVRT), geteilt durch die Ejektionszeit (ET):

$$(IVCT+IVRT)/ET$$

Dieser Wert liefert Aussagen über die globale Ventrikelfunktion, da er sowohl die systolische als auch die diastolische Ventrikelfunktion widerspiegelt.

Die echokardiographischen Messungen wurden von einer auf diesem Gebiet speziell ausgebildeten Person (Herr Dr. med. Baktybek Kojonazarov) ausgeführt, welche hinsichtlich der experimentellen Gruppen verblindet war. Die Auswertung und

Berechnung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe von Visual Sonics Vevo770 Programmen.

3.2.4 Hämodynamische Messung

Vor dem Beginn der hämodynamischen Messung wurden die Tiere zunächst einzeln gewogen.

Zur Durchführung der Messung mussten die Tiere narkotisiert werden. Dieses geschah in der Einleitungsphase in einem Plexiglaskasten, in den ein Sauerstoff/Isofluran (5%)-Gemisch eingeleitet wurde. Während der Messung wurde das Narkosegas (Isofluran 2% Erhaltungsdosis) über eine Beatmungsmaske zugeführt. Für die Untersuchung wurde die Maus in Rückenlage positioniert und fixiert. Zur Beurteilung von Herzfrequenz und EKG-Kurve wurde das Tier zudem noch an ein EKG angeschlossen.

3.2.4.1 Durchführung

Zunächst wurde im rechten Halsbereich der Maus die Vena jugularis dexter freipräpariert, um den Katheter einführen und in den rechten Ventrikel vorschieben zu können.

War der Katheter richtig platziert, was anhand der Druckkurven auf dem Monitor verifiziert wurde, wurde er in dieser Position fixiert. War ein Steady State der Kurven erreicht, wurden die Druckkurven über einen Zeitraum von 2-3 Minuten aufgezeichnet. Nach der Aufzeichnung wurde der Katheter aus der Vene entfernt und die Vene abgebunden, um Blutungen zu verhindern.

Als letztes wurde der systemische Blutdruck in der Arteria carotis sinister gemessen. Hierzu wurde in ähnlicher Weise vorgegangen.

Der Katheter war an ein Power Lab Acquisition System angeschlossen. Mithilfe der dazugehörigen Software (Chart) erfolgte die Aufzeichnung und Auswertung der Messparameter.

Die Durchführung der hämodynamischen Messungen erfolgte von Frau Dr.med.vet. Wiebke Janssen.

3.2.4.2 Messparameter

- Rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVPsys)

RVPsys ist definiert als der größte zum Zeitpunkt der Systole gemessene Druck im rechten Ventrikel und gibt somit Aufschluss über die systolische Herzfunktion.

- Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck (RVEDP)

RVEDP ist aussagekräftiger als der allgemeine diastolische Druck im rechten Ventrikel. Dieser ist definiert als Druck, der am Ende der Diastole kurz vor Beginn der systolischen Kontraktion im rechten Ventrikel gemessen wird. Ein Ansteigen dieses Wertes gibt Hinweise auf das Vorliegen einer diastolischen Dysfunktion, bedingt durch abnormale Relaxation, gestörte Füllung und verminderte Dehnungsfähigkeit aufgrund verschiedener Umbauprozesse im Myokard.

- Systolischer und diastolischer systemischer Blutdruck

In der linken Arteria carotis werden die systemischen Drücke gemessen, sowohl in der Diastole als auch in der Systole. Dieses dient dazu, eventuelle Einflüsse des Bandings auf die systemische Zirkulation darzustellen.

- Herzfrequenz (Herzschläge/min)

Die Herzfrequenz wird mit Hilfe des angelegten EKGs bestimmt.

3.2.5 Proben

3.2.5.1 Blutproben

Nach Abschluss der hämodynamischen Messung wurde die Maus durch Erhöhung der Narkosegaszufuhr auf 5% Isofluran und durch Blutentzug getötet.

Der Thorax wurde durch einen Schnitt unterhalb der Xiphoids mittels einer Präparierschere eröffnet und der Schnitt unter Durchtrennung der Rippenknorpel entlang des Sternums erweitert. Das Diaphragma wurde am Ansatz der Rippen abgelöst. Dann konnte der Processus xyphoideus des Sternums Richtung Kopf aufgeklappt werden, was freie Sicht auf die thorakalen Organe ermöglichte.

Das Blut wurde direkt aus dem rechten Ventrikel mithilfe einer Lithium-Heparin-Monovette entnommen. Insgesamt konnte ca. 1ml Blut/Maus entnommen werden.

Zur Gewinnung des Plasmas wurde das Blut 10 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Dann konnte das Plasma mit einer Spritze abgezogen werden.

Das Plasma wurde separat in Eppendorfcups gefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren.

3.2.5.2 Organproben

Nach der Tötung der Maus wurden verschiedene Organe einerseits für molekularbiologische, andererseits für histologische Untersuchungen entnommen.

Herz

Das Herz wurde mit einer Präparierschere vom umgebenden Gewebe abgetrennt und dem Thorax entnommen. Dann wurden die beiden Atrien sowie die großen Gefäße entfernt und der rechte Ventrikel entlang des Septums abgetrennt. Die Proben wurden in PBS gespült, um sie von anhaftendem koagulierte Blut zu befreien.

Schließlich lagen rechter Ventrikel und linker Ventrikel inklusive Septum getrennt vor. Beide Anteile wurden separat auf einer Analysenwaage gewogen, so dass man schließlich das Verhältnis der beiden Anteile zueinander bestimmen konnte, was Rückschlüsse auf den Ausprägungsgrad der Rechtsherzhypertrophie zulässt.

Heart ratio: Masse rechter Ventrikel [g] / (Masse linker Ventrikel + Septum [g])

Die Hälfte der gesamten Herzproben wurde für molekularbiologische Untersuchungen verwendet. Diese Proben wurden sofort nachdem sie präpariert und gewogen wurden, in beschriftete Eppendorfcups gefüllt und in Flüssigstickstoff tiefgefroren.

Die andere Hälfte der Proben diente den histologischen Untersuchungen. Die hierfür vorgesehenen Herzen wurden nach Präparation und Wiegen in 3,5%ige Formaldehydlösung überführt und in den folgenden Tagen weiter aufbereitet.

Lunge

Die einzelnen Lungenflügel wurden mit einer Präparierschere aus dem Thorax herauspräpariert, in PBS sauber gespült und in beschrifteten Eppendorfcups in Flüssigstickstoff tiefgefroren.

Zur Entnahme der Abdominalorgane wurde der Bauchraum längs mit einer Präparierschere in der Medianen eröffnet und die Wundränder zur Seite gezogen.

Niere

Von jeder Maus wurde die linke Niere entnommen. Die Nierenkapsel wurde entfernt und die Niere, ebenfalls in Eppendorfcups verpackt, in Flüssigstickstoff tiefgefroren.

Leber

Von jeder Maus wurden 1-2 Leberlappen entnommen. Diese wurden in PBS sauber gespült und in Eppendorfcups in Flüssigstickstoff tiefgefroren.

Tibia

Von jeder Maus wurde die linke Tibia freipräpariert und dem Tierkörper entnommen. Mit Hilfe einer elektrischen Schieblehre wurde die Länge der Tibia in mm bestimmt.

Dieser Wert diente als Beweis, dass die Tiere annähernd gleich alt sind und einen ähnlichen Entwicklungszustand aufweisen.

Am Abschluss des Tages wurden alle Organproben aus dem Flüssigstickstoff entnommen und bei -80°C für die weitere Lagerung tiefgefroren.

3.2.6 Histologie

3.2.6.1 Organaufbereitung und Präparaterstellung

Nach Entnahme des Herzens aus der frischtoten Maus wurde dieses mit Hilfe einer kleinen Präparierschere in rechten Ventrikel und linken Ventrikel inklusive Septum geteilt und beide Anteile separat gewogen.

Zur Fixation des Gewebes wurden beide Anteile in 3,5%ige Formaldehyd-Lösung (PFA) eingelegt. Nach Ablauf von 24 Stunden wurden die Herzanteile in PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) überführt. Diese Lösung wurde nach 24 Stunden einmal gewechselt, die Organteile verblieben somit für insgesamt 48 Stunden in dieser Lösung.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Organteile getrennt nach rechtem und linkem Ventrikel mit Septum in beschriftete Histologie-Plastikkassetten überführt und in 70%igem Ethanol gelagert. Über Nacht wurden die Präparate in einer Entwässerungsmaschine zur Vorbereitung auf die Paraffineinbettung dehydriert.

Bis zur Einbettung wurden die Organteile hiernach in heißem Paraffin gelagert und dann mit Hilfe einer Einbettungsmaschine in Paraffinblöcke gegossen.

Nach Aushärtung der Paraffinblöcke wurden mittels eines Mikrotoms 3µm dicke histologische Schnitte angefertigt. Für die geplanten Untersuchungen wurden sowohl Quer- als auch Längsschnitte der Kardiomyozyten benötigt. Die Schnitte wurden in einem 48°C warmen Wasserbad geglättet und anschließend auf Objektträger aufgezogen.

Die erstellten Präparate wurden bei 37°C 24 Stunden getrocknet und konnten anschließend gefärbt werden.

3.2.6.2 Picrosirius – Rot – Färbung – Quantifizierung der Fibrose

3.2.6.2.1 Durchführung

Diese Färbung dient zur Darstellung von Kollagen und wird zur Bestimmung des Fibrosegrades im rechten Ventrikel benutzt.

Zur Vorbereitung der Entparaffinierung wurden die erstellten Schnitte zunächst für 1 Stunde bei 58°C inkubiert (Paraffin schmelzen). Dann erfolgte die eigentliche

Entparaffinierung, indem die Schnitte 3x für jeweils 10 min. in Xylol und abschließend für 5 Minuten in 99,6%igen Alkohol eingelegt wurden.

Zur Rehydratation wurde eine absteigende Alkoholreihe benutzt (jeweils 5 Minuten in 99,6%, 96% und 70% Ethanol). Hiernach erfolgte eine 3-minütige Waschung in Aqua dest.

Jetzt erfolgte die eigentliche Färbung mit 0,1%iger Picrosirius-Rot-Färbelösung, hergestellt aus 200mg Sirius Rot verdünnt in 200ml Picrinsäure. Die hergestellte Lösung sollte einen pH-Wert von 2 haben, um sicherzustellen, dass sich der Farbstoff vollständig löst. Diese Lösung muss 1 Stunde lang einwirken.

Danach erfolgte eine dreimalige Spülung (jeweils 30 Sekunden) in 1%iger Essigsäure, sowie abschließend eine 1 minütige Klarspülung in Aqua dest..

Das Entfärben erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe: Jeweils 5 Minuten in 70%, 96% und 99,6% Ethanol.

Zur endgültigen Klärung wurde erneut Xylol benutzt, 1 Mal für 5 Minuten und abschließend nochmal für 1 Minute.

Noch vor Verdunsten der Flüssigkeit auf den Objektträgern mussten diese mittels Entellan und Deckgläsern verschlossen werden. Die Trocknung erfolgte über Nacht.

3.2.6.2.2 Auswertung

Der Grad der Fibrose wurde anhand der mit Picrosirius-Rot gefärbten Schnitte ermittelt. Mit Hilfe dieses Farbstoffes ist es möglich, Kollagen selektiv anzufärben.

Zur Untersuchung wurde ein Lichtmikroskop mit integrierter Kamera verwendet. Das Mikroskop ist an einen Computer angeschlossen. Die Analyse-Software Leica Q Win V3 diente zur Auswertung der Schnitte: Am Bildschirm erfolgte eine Markierung der fibrotischen Bezirke im Myokard, die Software errechnet selbständig den prozentualen Anteil an Gesamtkollagen bezogen auf das gesamte Myokard.

Zur Auswertung wurde pro Herz ein 3µm dicker histologischer Schnitt verwendet. Auf diesem wurden randomisiert 50 Gesichtsfelder betrachtet, indem der Schnitt mäanderförmig durchmustert wurde. Die 50 ausgewählten Felder wurden mit Hilfe der Kamera ab fotografiert und wie oben beschrieben ausgewertet.

Nach Abschluss der Untersuchung erhielt man 50 Werte in einer Exceltabelle, aus denen der Durchschnittswert bestimmt wurde.

3.2.6.3 WGA – FITC – Färbung – Kardiomyozytendurchmesser

3.2.6.3.1 Durchführung

Für diese Färbung sollten möglichst Querschnitte der Kardiomyocyten verwendet werden. Mit Hilfe der Färbung ist eine Trennung der einzelnen Kardiomyocyten im Herzgewebe möglich und der Durchmesser der Zellen kann bestimmt werden.

Die Entparaffinierung und Rehydratation in absteigender Alkoholreihe erfolgte in gleicher Weise wie bei der Picrosirius-Rot-Färbung. Nach Klärung der Schnitte in Aqua dest. erfolgte eine weitere Spülung für 5 Minuten in PBS.

Um ein Abfließen der Färbelösung zu verhindern, wurden die einzelnen Schnitte auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet.

Dann wurden zunächst jeweils 100µl BSA (10%) auf die einzelnen Schnitte pipettiert und für 1 Stunde zum Blocken auf den Präparaten belassen.

Danach erfolgte eine 4malige Waschung der Schnitte in PBS für jeweils 5 Minuten.

Anschließend wurde die WGA-FITC-Lösung (hergestellt aus 20µl WGA-FITC-Stocklösung verdünnt in 2000µl PBS → 1:100 verdünnt) auf die Schnitte aufgebracht und über Nacht darauf belassen. Wichtig ist es, die Schnitte von diesem Schritt an vor Licht zu schützen, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Die Lagerung der Schnitte und das Einwirken des Farbstoffes über Nacht erfolgte im Kühlschrank, bei einer Temperatur von 4°C.

Nach der Inkubation erfolgte am nächsten Morgen eine 2stündige Waschung der Schnitte in PBS. Hierfür wurden die Schnitte alle 5 Minuten in frische PBS-Lösung gehängt und auf dem Schüttler vorsichtig bewegt, um zu gewährleisten, dass alle überschüssige Färbelösung entfernt wurde.

Dann erfolgte zusätzlich eine Kernfärbung mit DAPI (4'6-diamindino-2-phenylindol). Dieser Fluoreszenz-Farbstoff bindet an DNA und diente somit zur Darstellung der Zellkerne.

Die Färbelösung wurde aus 0,5µl DAPI, verdünnt in 5ml PBS hergestellt und musste 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Nach dieser Zeit wurden die Schnitte 3 Mal für 5 Minuten in PBS gewaschen und abschließend mit Dako-Fluorescence-Mounting-Medium und Deckgläsern eingedeckt. Dieses spezielle Medium soll ein Ausbleichen der Fluoreszenz-Farbstoffe verhindern.

Die Schnitte mussten lichtgeschützt bei 4°C gelagert werden und konnten nun am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

3.2.6.3.2 Auswertung

Die benutzten Fluoreszenzfarbstoffe markieren die Zellgrenzen (WGA FITC) und Zellkerne (DAPI), was die Ausmessung des Durchmessers erlaubt. Zur Untersuchung wurde ein Fluoreszenzmikroskop, sowie die Analyse-Software Leica Q Win V3 verwendet.

Es wurde pro Herz ein WGA-FITC gefärbter Histologieschnitt ausgewertet. Auf diesem wurden randomisiert 5 Gesichtsfelder betrachtet und der Durchmesser aller Kardiomyozyten bestimmt, in denen ein Kern zu sehen war. Hierdurch wurde gewährleistet, dass die Zellen ungefähr auf gleicher Höhe angeschnitten waren.

Aus den erhaltenen Werten wurde am Ende der Durchschnittswert für jedes einzelne Tier berechnet.

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1 Probenherstellung und quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinaufreinigung aus Gewebe

Die Aufreinigung der Proteine aus Gewebe vom rechten Ventrikel wurde mithilfe des Precellyssystems durchgeführt. Als Medium wurde Radioimmunoprecipitation (RIPA)-Puffer, versetzt mit EDTA und Protease-Phosphatase-Inhibitor, verwendet. 300µl RIPA-Puffer wurde zusammen mit ca. 10mg Gewebe in Precellys-Röhrchen gegeben und 3x für jeweils 30 sec. homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 30min. bei 4°C und 15000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in neue Reaktionsgefäße überführt.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Aus den hergestellten Proben wurde mithilfe von DPBS eine 1:10fache Verdünnung hergestellt. Die restliche Probe wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Pierce ® BCA Protein Assay Kit verwendet. Diesem liegt die Bicinchinonsäurereaktion zugrunde. Die im Reagenz enthaltenen zweiwertigen Kupferionen reagieren quantitativ mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen (Biuret-Reaktion). Diese ergeben dann mit der Bicinchinonsäure einen violetten Farbumschlag, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm photometrisch gemessen werden kann.

Nach der Konzentrationsbestimmung der einzelnen Proben wurden die Ausgangsproben jeweils so mit DPBS verdünnt, dass anschließend jede Probe eine Proteinkonzentration von 4µg/µl aufwies. 100µl jeder Probe wurden mit 25µl Laemmli-Puffer (β-Mercaptoethanol) versetzt und 5min. bei 95°C aufgekocht. Abschließend wurde jede Probe bei 20°C und 10000g 3min. zentrifugiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.2 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die Gelelektrophorese dient dazu, die einzelnen Proteine eines Proteingemisches in einem elektrischen Feld nach ihrer Molmasse aufzutrennen. Als Trennmedium dient ein diskontinuierliches Gel auf Polyacrylamidbasis. Für die durchgeführten Versuche wurden 10%ige Gele verwendet. Die einzelnen Taschen des Gels wurden mit den vorbereiteten Proben beladen, wobei in die erste Tasche des Gels ein Marker geladen wurde (Kaleidoskop, Biorad). Die Auftrennung erfolgte im Laufpuffer und einer Apparatur von Biorad bei 100V, 400mA für 1-2h bei Raumtemperatur. Es wurden ca. 40µg Gesamtprotein/Probe eingesetzt.

Proteintransfer und Antikörperinkubation

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Kühlblock, 1h, 100V, 400mA). Anschließend wurde die Membran mit 5%igem Milchpulver gelöst in 'TBST' für 1,5h geblockt. Nun wurde der primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung (ERK1/2: 1:1000, p-ERK: 1:600, Sprouty1:

1:600) in Milch aufgetragen. Dieser wurde über Nacht bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurde die Membran 3x für 10min. mit TBST gewaschen und anschließend der sekundäre Antikörper (gekoppelt mit einer Meerrettichperoxidase) aufgetragen, mit welchem die Membran für ca. 1,5-2h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Es folgte wiederum das Waschen der Membran für 3x 10 min. mit TBST.

Entwicklung

Die Entwicklung der Membran erfolgte in der Entwicklertaschine von Intas (ChemoStar). Als Entwicklerlösung wurde entweder Super Signal West Femto oder Amersham ECL Prime (1ml/Membran) benutzt. Die Entwicklerlösung wurde nach dem Entwickeln durch 2maliges Waschen mit TBST entfernt und die Membran wurde anschließend mittels Stripping Puffer zum Entfernen des Antikörpers gestript. Nach einem weiteren 3maligen Waschvorgang konnte nun nach Bedarf ein weiterer primärer Antikörper auf die Membran aufgetragen werden. Alternativ wurde der Blot mit Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) – Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 inkubiert. Dieser fungierte als Ladekontrolle. Der Blot wurde wie zuvor beschrieben behandelt.

Auswertung

Die Auswertung der entwickelten Banden erfolgte mit Hilfe der Software Image J. Diese detektiert nach dem Prinzip der Densitometrie quantitativ die Dichte der einzelnen Banden. Je dichter die Bande, umso höher ist die Konzentration des entsprechenden Proteins in der Probe.

Da insgesamt 24 verschiedene Proben vorhanden waren, mussten für jeden Blot 2 Membranen verwendet werden. Diese wurden gleichzeitig geblottet, sowie gleichzeitig entwickelt und ausgewertet, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Bei der Auswertung wurden alle Proben zu ihrer Ladekontrolle (GAPDH) ins Verhältnis gesetzt. Als interne Kontrolle wurde zudem jeweils eine Probe benutzt, die auf beiden zusammengehörenden Membranen aufgetragen wurde. Zu dieser Probe wurden dann bei der Auswertung alle anderen Proben der jeweiligen Membran prozentual ins Verhältnis gesetzt.

3.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mittels ELISA können Proteine in einer Probe nachgewiesen werden. Das nachzuweisende Antigen bindet an einen Antikörper, welcher an der Mikrotiterplatte fixiert ist. Mithilfe eines zweiten Enzym-gekoppelten Detektions-Antikörper wird das Vorhandensein des Antigens sichtbar gemacht: Über eine durch das Enzym katalysierte Reaktion wird ein Substrat umgesetzt, welches zu einem Farbumschlag führt und photometrisch gemessen werden kann.

Zur Bestimmung des Gehaltes an NT-proBNP im Lithium-Heparin-Plasma der Mäuse wurde ein ELISA-Kit der Firma Usckn verwendet. BNP ist ein Hormon aus 32 Aminosäuren, welches bei Dehnung der Herzkammern von den Herzmuskelzellen ausgeschüttet wird. Bei Bindung an eine membranständige Guanylatzyklase sorgt es über vermehrte Bildung von cGMP für eine verminderte Ausschüttung von Calcium und somit für die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Dieses führt zur Senkung der Vor- und Nachlast am Herzen. BNP wird daher als diagnostischer Marker für Herzinsuffizienz benutzt, die Höhe der BNP-Konzentration im Blut korreliert mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz. In dem hier durchgeführten ELISA wurde anstatt BNP NT-proBNP gemessen. Dieses entsteht zu gleichen Teilen wie BNP aus der Vorstufe proBNP. NT-proBNP ist zwar biologisch unwirksam, liegt in Blutproben aber stabiler vor und liefert daher genauere Messwerte.

3.4.1 Durchführung

Vor Beginn der Durchführung müssen alle Komponenten des Kits sowie die einzusetzenden Proben auf Raumtemperatur angewärmt werden.

Zunächst wurde der mitgelieferte Standard angesetzt und eine Verdünnungsreihe entsprechend des mitgelieferten Protokolls angelegt. Anhand der Konzentrationen des Standards sollte später die Standardkurve erstellt werden.

Desweiteren wurden die Proben mit dem gleichen Verdünnungsmittel, mit dem auch der Standard verdünnt wurde, 1:2 verdünnt.

Die 96 well Microtiterplatte ist mit einem NT-proBNP-spezifischen Antikörper beschichtet. Es wurden 100µl Standard bzw. Probe als Doppelansatz in die zuvor

festgelegten Wells pipettiert. Anschließend wurde die Platte 2 Stunden bei 37°C inkubiert., so dass eine Antigen-Antikörper-Bindung stattfinden konnte.

Nach Ablauf der 2 Stunden wurde die Flüssigkeit aus den Wells entfernt und in jedes Well wurden 100µl einer mitgelieferten Detektionslösung pipettiert. Die Detektionslösung enthielt Biotin-konjugierte Antikörper, die ebenfalls spezifisch für NT-proBNP sind. Es erfolgte wiederum eine Inkubation bei 37°C für 1 Stunde.

Nach Beendigung der Inkubation wurde erneut die komplette Flüssigkeit aus den Wells entfernt und es folgte ein dreimaliger Waschvorgang: Hierfür wurden 350µl der mitgelieferten Waschlösung in jedes Well pipettiert und 1-2 min. einwirken gelassen. Der Waschvorgang wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, zwischen den einzelnen Waschgängen wurde jedes Mal die gesamte Flüssigkeit entfernt und die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft.

Als nächstes wurden 100µl der zweiten im Kit enthaltenen Detektionslösung in jedes Well pipettiert. Diese Lösung enthält Avidin-konjugierte Meerrettichperoxidase. Avidin ist in der Lage, das zuvor aufgetragene Biotin zu binden.

Die Platte wurde erneut bei 37°C für 30 min. inkubiert.

Als nächstes wurde der Waschvorgang wie zuvor beschrieben 5 Mal wiederholt.

Nach dem letzten Waschvorgang wurde gründlich alle Flüssigkeit aus jedem Well entfernt und 90µl des mitgelieferten Substrates (TMB) in jedes Well pipettiert. Das Substrat sorgt dafür, dass nur in den Wells, die NT-proBNP, den Biotin-konjugierten Antikörper, sowie das Enzym-konjugierte Avidin enthalten, ein Farbumschlag stattfindet. Da das Substrat lichtempfindlich ist, mussten alle folgenden Schritte im abgedunkelten Raum durchgeführt werden. Die Substrat-Enzym-Reaktion führte zu einem blauen Farbumschlag. Die Platte wurde hierfür 15-25 min. bei 37°C inkubiert.

Zur Beendigung der Substrat-Enzym-Reaktion wurde nach Ablauf der Inkubation in jedes Well 50µl Stopplösung (enthält Schwefelsäure) pipettiert. Die Zugabe der Stopplösung führte zu einem gelben Farbumschlag.

Die Intensität der Färbung wurde im Tecan® ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen und die Konzentration von NT-proBNP in den einzelnen Proben wurde durch Vergleich der Werte mit denen der Standardkurve bestimmt.

3.4.2 Auswertung

Die Auswertung des ELISA erfolgte mit Hilfe des Tecan® ELISA Readers und der zugehörigen Software Magellan. Alle Standards und Proben wurden als Doppelansätze angelegt. Um möglichst genaue Werte zu erhalten, wurden von den zusammengehörenden Standards und Proben die Durchschnittswerte ermittelt und die Dichte des Blank-Standards abgezogen. Mithilfe der Software wurden anhand der vom Programm erstellten Standardkurve aus den gemessenen Dichten der einzelnen Proben, die Konzentrationen berechnet.

3.5 Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR)

3.5.1. Aufreinigung von RNA aus Gewebe

Zur Quantifizierung der miR-21 mittels RT-PCR wurde Gewebe des linken Ventrikels verwendet. Das mit Quiazol®-Reagent versetzte Gewebe wurde zunächst im Homogenisator (Fastprep®) homogenisiert, anschließend 15min. bei 4°C und 12000g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde, dem Protokoll des miRNEasy Mini Kit (Qiagen) folgend, die RNA isoliert.

3.5.2. RT-PCR

Reverse Transkription

Die Reverse Transkriptase wird verwendet, um RNA in cDNA (komplementäre DNA) umzuschreiben. Somit können kleinste RNA Mengen nachgewiesen und quantifiziert werden. Für die hier durchgeführten Versuche wurde ein TaqMan® Small RNA Assay („Taq Man microRNA RT Kit # 4366597“) von life technologies™ verwendet.

Pro Ansatz (15µl) wurden 1-10 ng RNA in cDNA umgeschrieben.

Folgender Mastermix wurde verwendet:

100 mM dNTPs	0,15µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase, 50 U/µl	1,00µl
10x Reverse Transkription Puffer	1,50µl
RNase Inhibitor, 20U/µl	0,19µl
Nuklease-freies Wasser	4,16µl

7µl Mastermix wurden mit 5µl RNA versetzt. Zu diesem Gemisch wurden anschließend 3µl im Kit enthaltene Primer (dNTP Mix) gegeben.

Die Umschreibung erfolgte nach folgendem Programm:

30min.-16°C

30min.-42°C

5min.-85°C

∞-4°C

Polymerase Kettenreaktion

Der qPCR-Reaktionsmix wurde folgendermaßen angesetzt:

TaqMan®Small RNA Assay (20x)	1µl
Produkt der RT Reaktion	1,33µl
TaqMan®Universal PCR Master Mix II	10µl
Nuklease freies Wasser	7,67µl

Für jede Reaktion wurden 4 Replikate angesetzt. In jedes well der PCR-Platte wurden 20µl des angesetzten Reaktionsmixes pipettiert.

Am StepOne Plus von Life Technologies wurde die qPCR nach folgendem Programm durchgeführt:

95°C-20sec.(Enzymaktivierung)

95°C-1sec.(Denaturierung)

60°C-20sec. (Annealing/Extension)

Die Schritte 2 und 3 erfolgten über 40 Zyklen.

3.5.3. Analyse und Auswertung der RT-PCR Daten

Um Störfaktoren auszuschließen wird in derselben Probe die Expression des Zielgens und eines Referenzgens (in diesem Fall U6) parallel erfasst und die ermittelten Werte des Zielgens relativ zu dieser internen Kontrolle angegeben.

Hierzu diente die Berechnung des ΔC_t (Cycle threshold)-Wertes:

$$\Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Referenzgen})$$

Die RT-PCR wurde von Frau Ariane Fischer (Goethe Universität Frankfurt/Main) durchgeführt.

3.6 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Graph Pad Prism 5 Software verwendet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Die Signifikanzdarstellung beim statistischen Vergleich mehrerer Tiergruppen wurde mittels der Varianzanalyse (ANOVA) und des Student Newman-Keuls post hoc-Tests durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ galt bei allen Versuchen als statistisch signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Organwerte

4.1.1 Körpergewicht

Zum Zeitpunkt der Operation unterschied sich das Körpergewicht der Mäuse in den einzelnen Gruppen nicht signifikant. Über alle Gruppen gemittelt lag ein durchschnittliches Körpergewicht von $21,6\text{g} \pm 1,2$ vor.

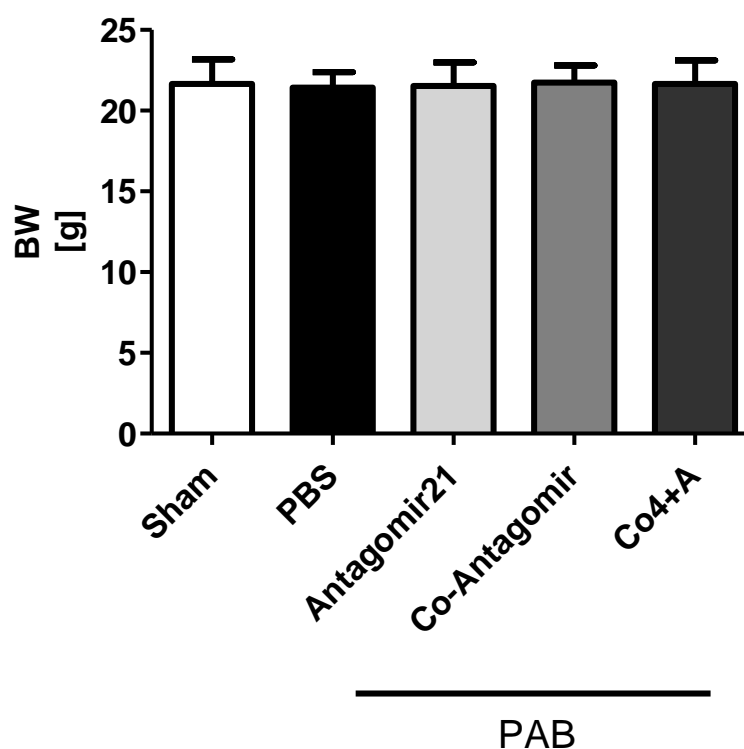


Abbildung 14: Körpergewicht zum Zeitpunkt der Operation

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, n=11-13

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 Tag (8mg/kg) 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.1.2 Veränderungen des Körpergewichts

3 Wochen post operativ, zum Zeitpunkt der hämodynamischen Messungen, waren in den operierten Gruppen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Veränderung im Körpergewicht festzustellen. (PBS: $0,92\text{g} \pm 0,4$; Antagomir21: $1,73\text{g} \pm 0,47$; Co-Antagomir: $1,26\text{g} \pm 0,32$; Co4+A-Antagomir: $1,61\text{g} \pm 0,37$). Die Shamtiere zeigten mit einem Anstieg von $2,76\text{g} \pm 0,23$ jedoch eine signifikant höhere Gewichtszunahme.

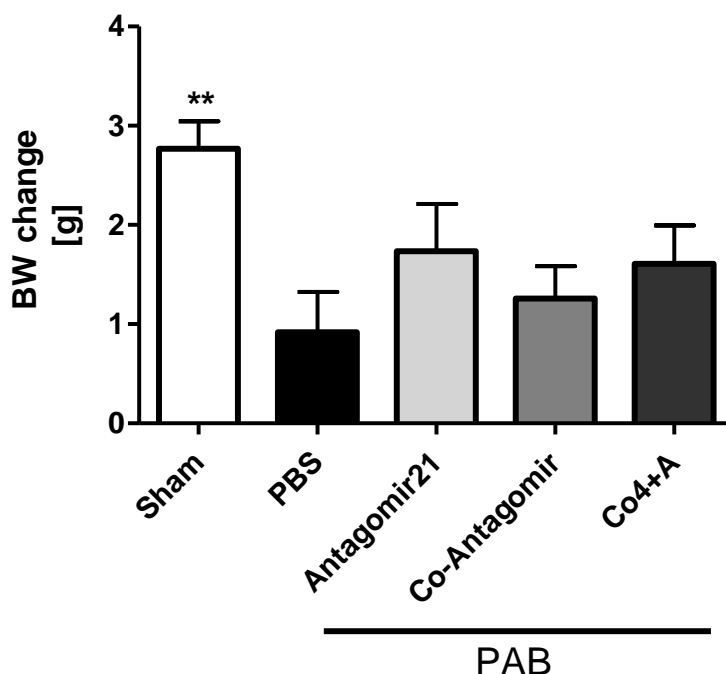


Abbildung 15: Körpergewicht 3 Wochen post op

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, ** $p \leq 0,01$ bezogen auf PBS, n=11-13

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.1.3 Tibiallänge

Die Länge der Tibia gibt Aufschluss über den Entwicklungszustand der Mäuse. In den einzelnen Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede in der Länge der Tibia zu verzeichnen. Gemittelt über alle Gruppen betrug die Länge der Tibia zum Zeitpunkt der Organentnahme $15,7\text{cm} \pm 0,46$.

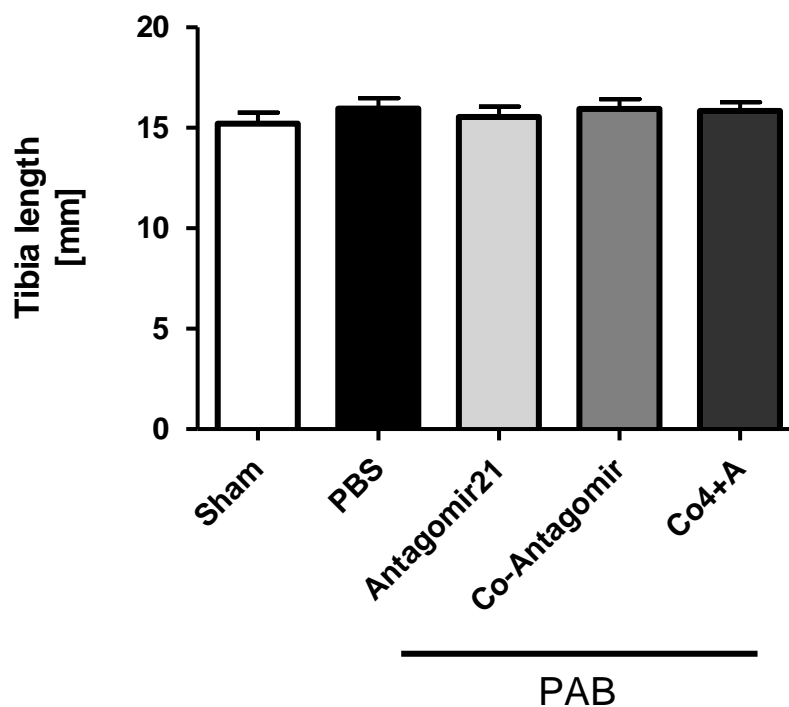


Abbildung 16: Tibiallänge 3 Wochen post op
ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, n=11-13

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie
PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS
Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op
Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op
Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.1.4 RV / (LV+S)

Das Verhältnis der Masse des rechten Ventrikels dividiert durch die Masse des linken Ventrikels inklusive Septum spiegelt die Ausprägung der rechtsventrikulären Hypertrophie wider. Im Vergleich zu den Sham-Mäusen war die Rechtsherzhypertrophie bei allen Mäusen, die der PAB-Operation unterzogen wurden, signifikant deutlich ausgeprägt. (Sham: $0,29 \pm 0,04$; PBS: $0,49 \pm 0,1$; Antagomir21: $0,44 \pm 0,08$; Co-Antagomir: $0,45 \pm 0,12$; Co4+A-Antagomir: $0,47 \pm 0,09$)

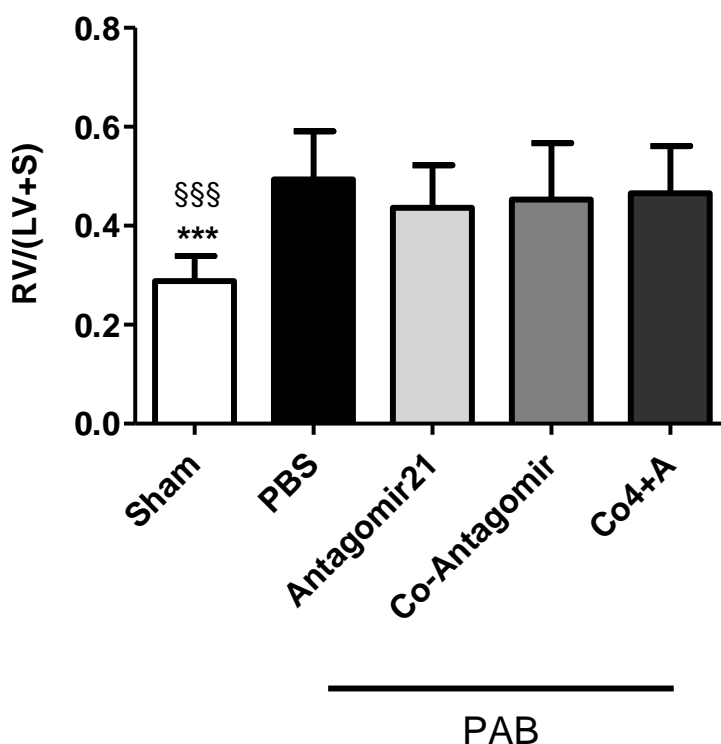


Abbildung 17: RV/(LV+S)

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, *** $p \leq 0,001$ bezogen auf PBS; §§§ $p \leq 0,001$ bezogen auf Antagomir21, n=11-13

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.2 Hämodynamik

4.2.1 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz der Mäuse betrug in allen Gruppen im Durchschnitt zwischen 416 ± 14 (Sham) und 371 ± 12 (Co4+A) Schläge/min. Zwischen den einzelnen Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede deutlich.

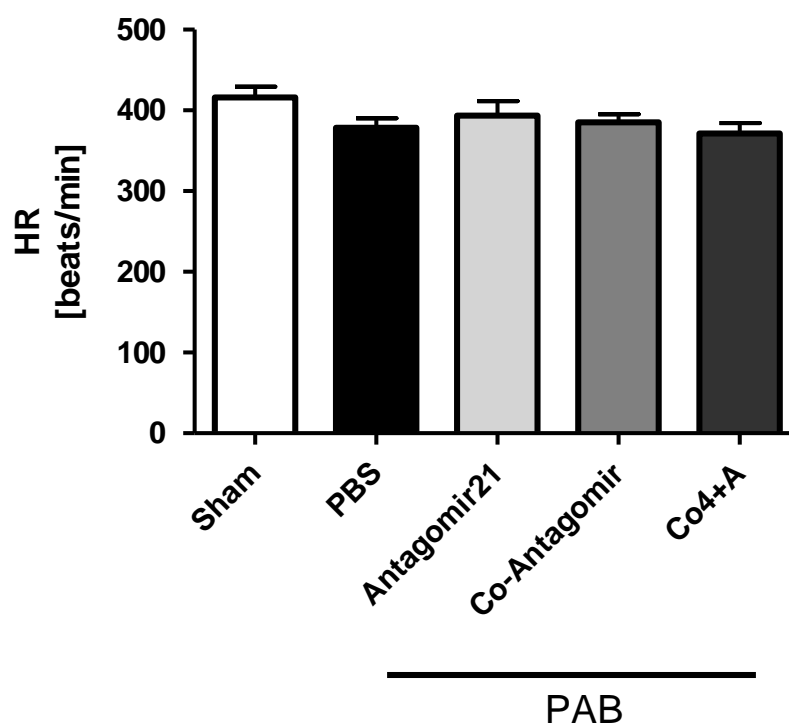


Abbildung 18: Herzfrequenz

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, n=9-13

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.2.2 Systolischer systemischer Blutdruck

Der systolische systemische Blutdruck, ein Parameter, der Aussagen über die Blutzirkulation und Sauerstoffdistribution im Körperkreislauf zulässt, zeigte bei den gebänderten Tieren signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu den Sham-Mäusen (Sham: 90,1mmHg \pm 2,5; PBS: 71,3mmHg \pm 1,3; Antagomir21: 79,3mmHg \pm 1,3; Co-Antagomir: 75,5mmHg \pm 3,5; Co4+A-Antagomir: 79,2mmHg \pm 3,3).

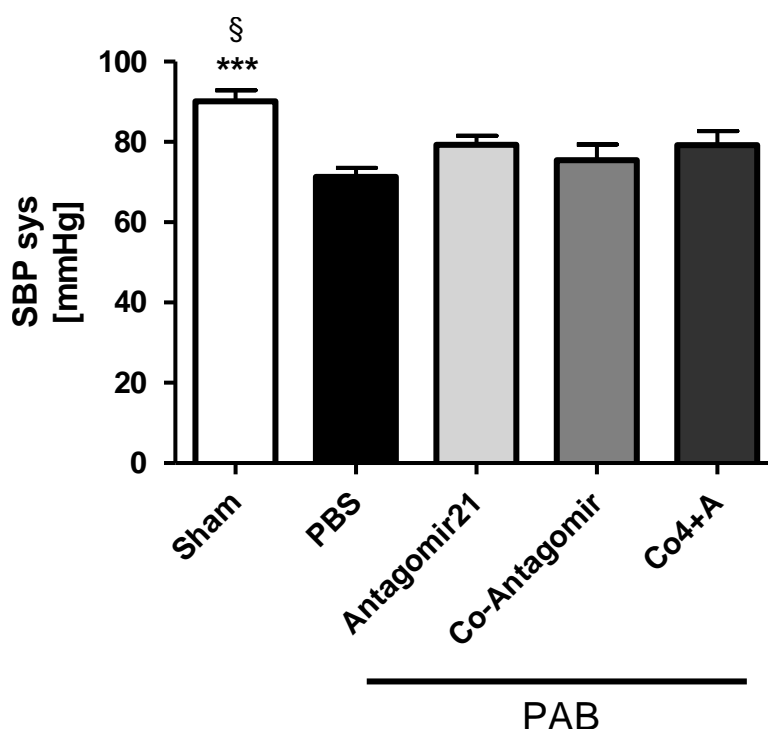


Abbildung 19: Systolischer systemischer Blutdruck

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, *** $p \leq 0,001$ bezogen auf PBS; § $p \leq 0,05$ bezogen auf Antagomir21, n=9-13

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.2.3 Diastolischer systemischer Blutdruck

Im systemischen diastolischen Blutdruck ließen sich zwischen Sham- und PAB-Tieren keine signifikanten Unterschiede feststellen (Sham: 61,6mmHg \pm 2,1; PBS: 53,4mmHg \pm 1,4; Antagomir21: 59,6mmHg \pm 1,2; Co-Antagomir: 56,4mmHg \pm 2,4; Co4+A-Antagomir: 55,9mmHg \pm 2,1).

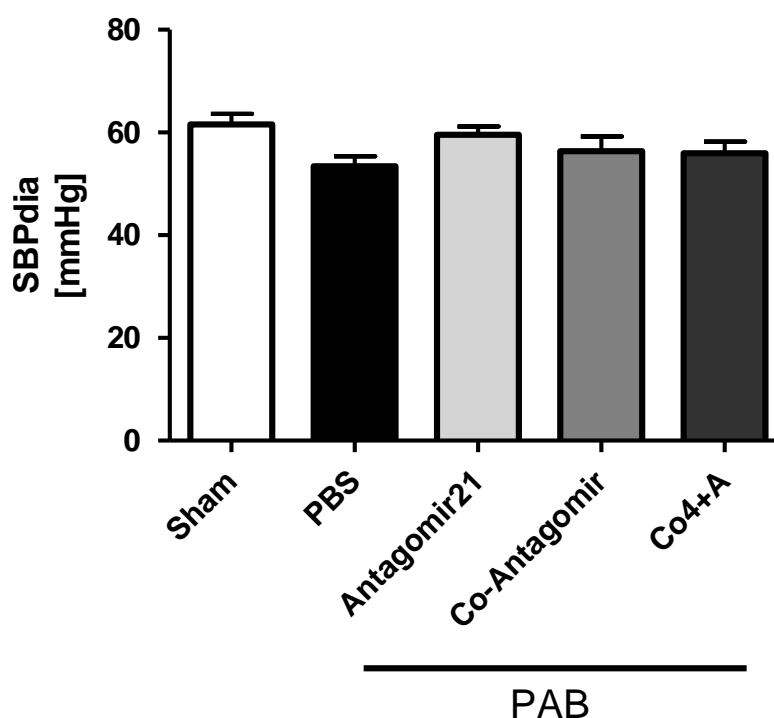


Abbildung 20: Diastolischer systemischer Blutdruck

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, n=9-13

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.2.4 Rechtsventrikulärer systolischer Druck

Der rechtsventrikuläre systolische Druck stieg bei den PAB-operierten Tieren im Vergleich zu den Sham-Tieren signifikant an (Sham: $24,5\text{mmHg} \pm 0,3$ – PAB (über alle Gruppen gemittelt): $55,7\text{mmHg} \pm 2,46$). Die operierten Tiere erreichten durchschnittlich doppelt so hohe Werte wie die Sham-Mäuse. In den einzelnen PAB-Gruppen unterschieden sich die Werte jedoch nicht signifikant, was bestätigt, dass das Banding bei allen Mäusen gleiche Effekte erzielt hat.

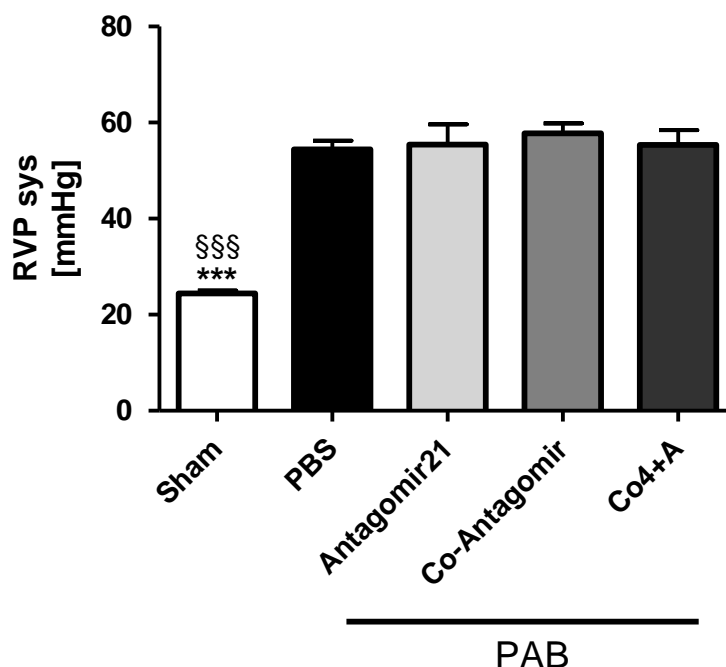


Abbildung 21: Rechtsventrikulärer systolischer Druck

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, *** $p \leq 0,001$ bezogen auf PBS; §§§ $p \leq 0,001$ bezogen auf Antagomir21, $n=9-13$

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.2.5 Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck

Der rechtsventrikuläre Druck am Ende der Diastole ist bei den PAB-Mäusen signifikant erhöht. Im Vergleich zu den Sham-Tieren, die mittlere Werte von $2,5\text{mmHg} \pm 0,3$ aufweisen, liegen bei den gebändeten Mäusen durchschnittlich mehr als doppelt so hohe Drücke (zwischen $5,4\text{mmHg} \pm 0,6$ und $6,4\text{mmHg} \pm 0,4$) vor.

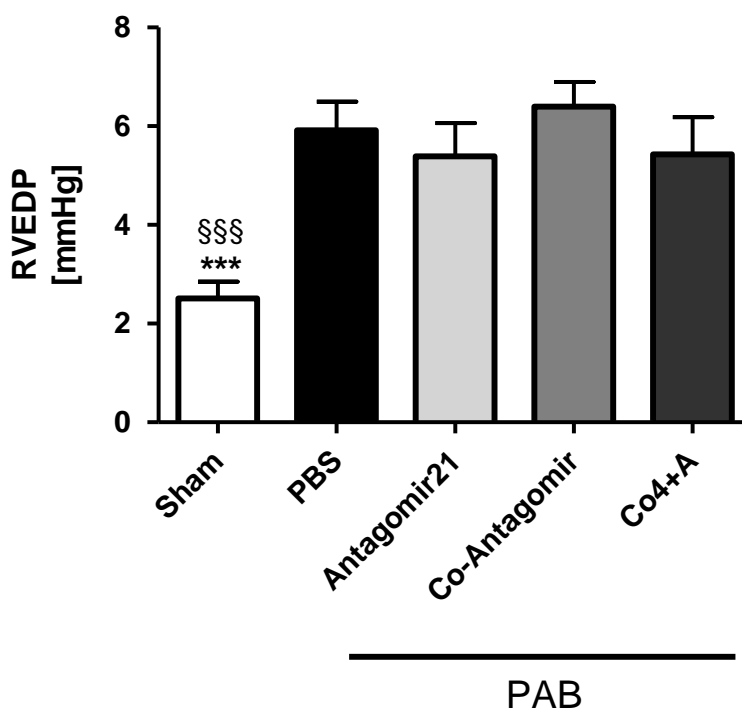


Abbildung 22: Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, *** $p \leq 0,001$ bezogen auf PBS; §§§ $p \leq 0,001$ bezogen auf Antagomir21, $n=9-13$

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.3 Echokardiographie

4.3.1 Herzzeitvolumen

Das Herzzeitvolumen ist der wichtigste funktionelle Herzparameter. Hier konnten deutliche Unterschiede zwischen den mit Antagomir21 behandelten Mäusen und den übrigen PAB-Gruppen aufgezeigt werden. Die Behandlung mit Antagomir21 ließ das Cardiac Output signifikant ansteigen (Sham: 19,09ml/min. \pm 2,11; PBS: 6,42ml/min. \pm 0,64; Antagomir21: 11,6ml/min. \pm 0,7; Co-Antagomir: 7,84ml/min. \pm 0,6; Co4+A-Antagomir: 7,04ml/min. \pm 0,77).

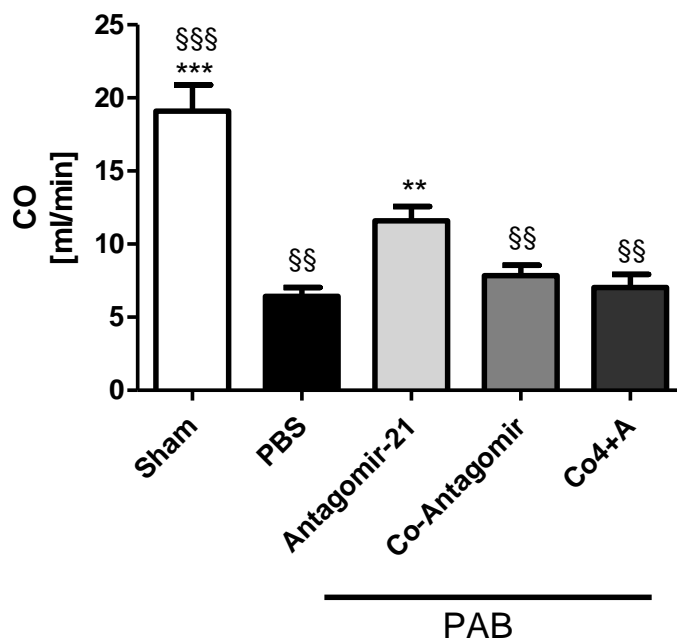


Abbildung 23: Cardiac Output

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ bezogen auf PBS; §§ $p \leq 0,01$, §§§ $p \leq 0,001$ bezogen auf Antagomir21, n=9-12

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.3.2 Cardiac Index

Bei der Berechnung des Cardiac Index wird das Herzauswurfvolumen ins Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt. Auch hier war unter der Behandlung mit Antagomir-21 ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen (Sham: $0,8 \pm 0,19$; PBS: $0,3 \pm 0,09$; Antagomir21: $0,5 \pm 0,13$; Co-Antagomir: $0,4 \pm 0,11$; Co4+A-Antagomir: $0,3 \pm 0,12$).

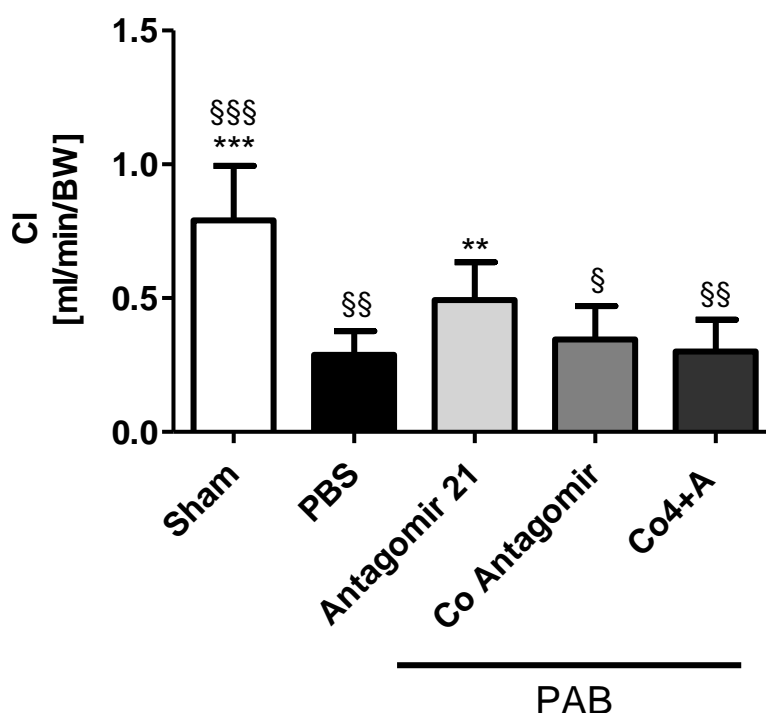


Abbildung 24: Cardiac Index

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ bezogen auf PBS; § $p \leq 0,05$, §§ $p \leq 0,01$, §§§ $p \leq 0,001$ bezogen auf Antagomir21, n=9-12

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.3.3 Rechtsventrikulärer innerer Durchmesser

Der innere Durchmesser des rechten Ventrikels ist ein Messparameter für die Dilatation. Die mit Antagomir-21 behandelten Mäuse wiesen signifikant kleinere Durchmesser des rechten Ventrikels ($1,96\text{mm} \pm 0,08$) im Vergleich zu den Kontrollgruppen ($2,14\text{mm} \pm 0,16$ im Mittel) auf. Bei den Sham-Mäusen betrug der Durchmesser $1,67\text{mm} \pm 0,07$. Bei den mit Placebo behandelten Tieren $2,12\text{mm} \pm 0,15$.

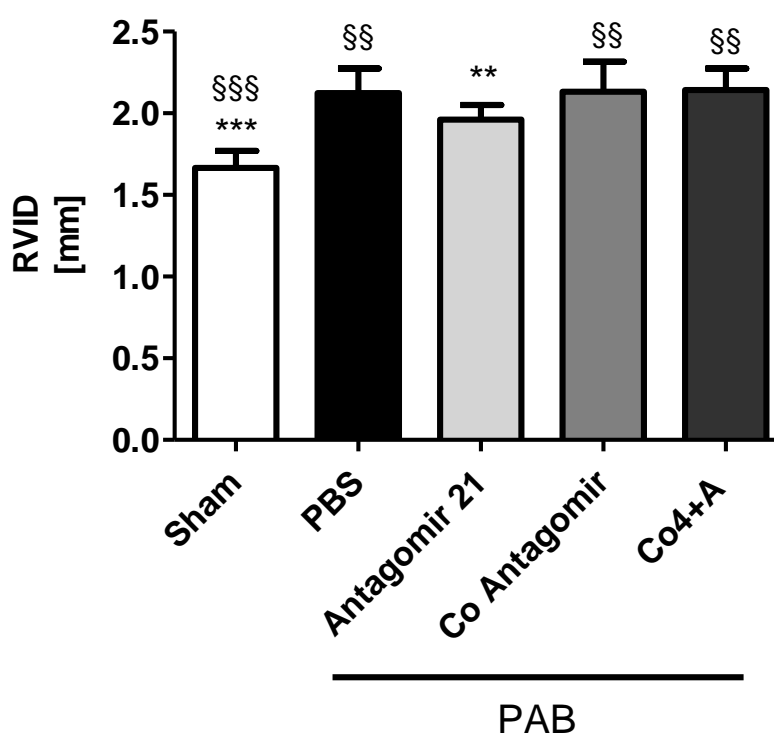


Abbildung 25: Rechtsventrikulärer innerer Durchmesser

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ bezogen auf PBS; §§ $p \leq 0,01$, §§§ $p \leq 0,001$ bezogen auf Antagomir21, $n=9-12$

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.3.4 Myocardial Performance Index (Tei)

Tei ist ein Maß für die systolische und diastolische Herzfunktion. Dieser betrug bei den Sham-Mäusen $0,77 \pm 0,08$; bei den mit Placebo behandelten Tieren $1,42 \pm 0,29$, bei den Kontrollgruppen im Mittel $1,45 \pm 0,29$ und bei den mit Antagomir-21 behandelten Mäusen $1,11 \pm 0,18$. Somit war unter der Behandlung eine signifikante Reduktion des Wertes zu verzeichnen.

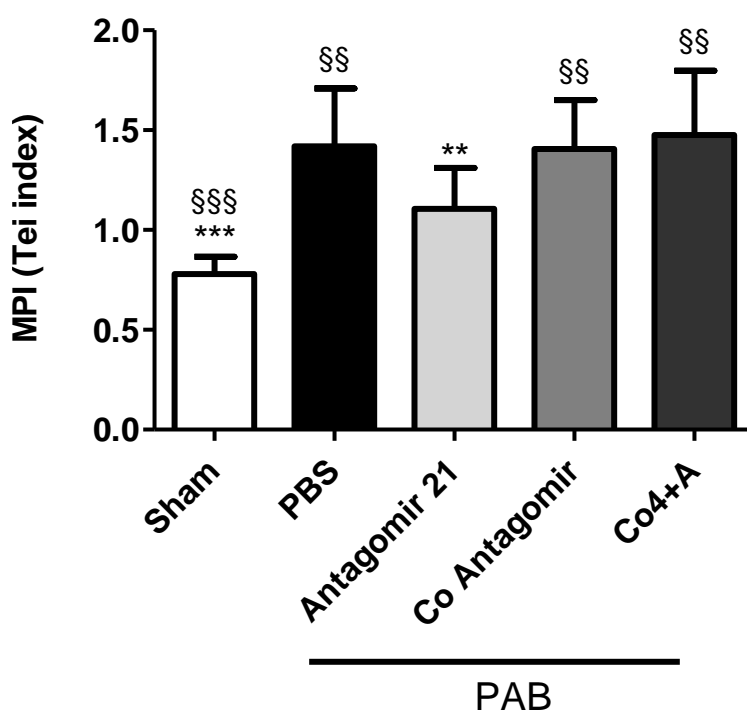


Abbildung 26: Myocardial Performance Index

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ bezogen auf PBS; §§ $p \leq 0,01$; \$\$\$ $p \leq 0,001$ bezogen auf Antagomir21, n=9-12

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.3.5 Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion (TAPSE)

TAPSE stellt einen Parameter für die Kontraktionsfähigkeit des rechten Ventrikels dar. Die Bewegung des Trikuspidalanulus Richtung Herzspitze beträgt bei den scheinoperierten Mäusen $1,47\text{mm} \pm 0,02$, bei den mit Placebo behandelten Tieren $0,69 \pm 0,16$, in den Kontrollgruppen im Mittel $0,74\text{mm} \pm 0,21$ und in der mit Antagomir-21 behandelten Gruppe $1,06\text{mm} \pm 0,19$. Somit lässt sich unter der Behandlung eine signifikante Erhöhung des Parameters erkennen.

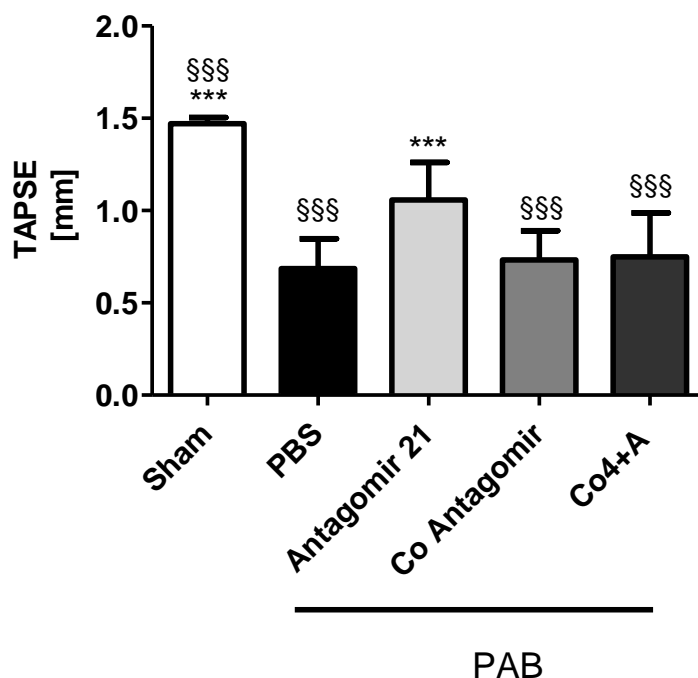


Abbildung 27: Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, *** $p \leq 0,001$ bezogen auf PBS; §§§ $p \leq 0,001$ bezogen auf Antagomir21, n=9-12

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.4 Histologie

4.4.1 Fibrose

Infolge der PAB-Operation entwickelte sich ein kardiales Remodeling und der Gehalt an Gesamtkollagen im Herzen stieg im Vergleich zu den Sham-Mäusen signifikant an ($9,2\% \pm 1,3$ im Vergleich zu $0,2\% \pm 0,1$). In der mit Antagomir-21 behandelten Gruppe war ein deutlicher Trend der Reduzierung des Kollagengehaltes im Herzen sichtbar ($5,3\% \pm 0,4$).

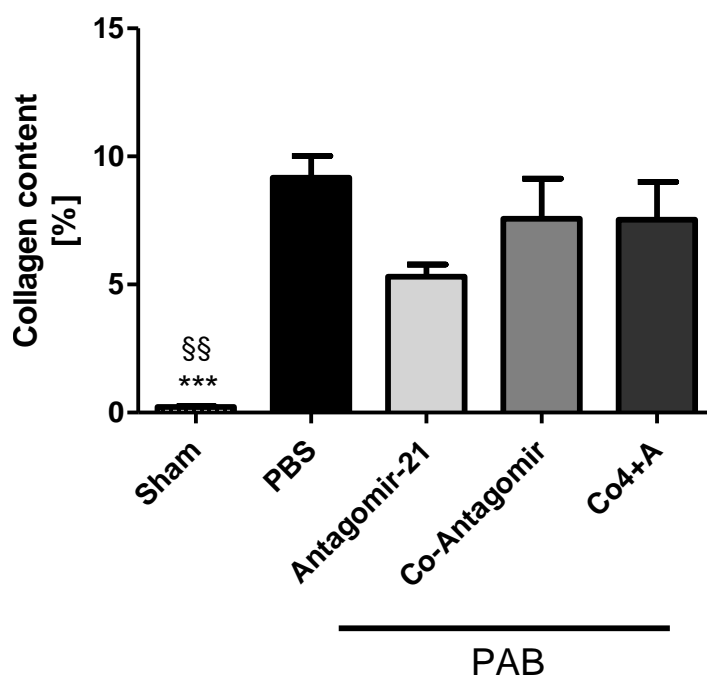


Abbildung 28: Kollagengehalt

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, *** $p \leq 0,001$ bezogen auf PBS; §§ $p \leq 0,01$ bezogen auf Antagomir21, $n=6-7$

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

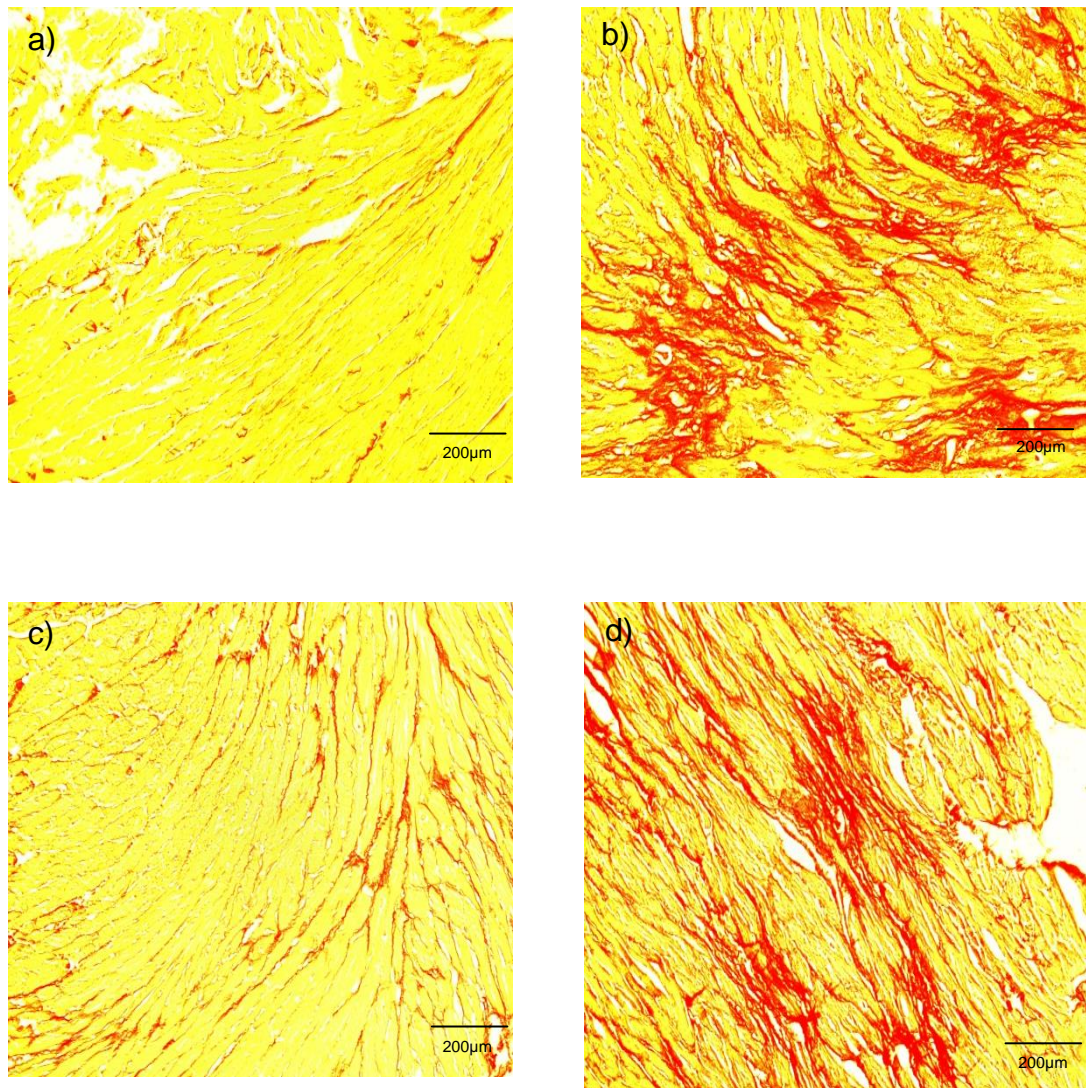


Abbildung 29: Picrosirius-Rot-Färbung zur Darstellung von Kollagen (rot)

a) Sham, **b)** Placebo, **c)** Antagomir-21, **d)** Co-Antagomir

(Vergrößerung 400fach)

4.4.2 Kardiomyozytendurchmesser

Der Kardiomyozytendurchmesser spiegelt die Ausbildung der rechtsventrikulären Hypertrophie wider. Die gebandeten Mäuse zeigten im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen eine signifikante Erhöhung des Kardiomyozytendurchmessers ($16,9\mu\text{m} \pm 0,54$ gegenüber $13,4\mu\text{m} \pm 0,61$). Eine leichte Verkleinerung der Kardiomyozyten ($15,7\mu\text{m} \pm 0,6$) zeigte sich in der mit Antagomir-21 behandelten Gruppe. Diese Veränderung war jedoch nicht signifikant.

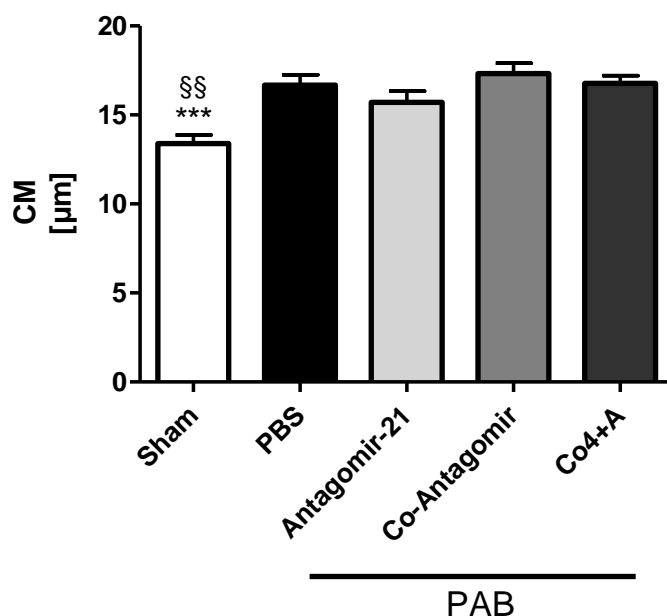


Abbildung 30: Kardiomyocytenendurchmesser

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, *** $p \leq 0,001$ bezogen auf PBS; §§ $p \leq 0,01$ bezogen auf Antagomir21, $n=6-7$

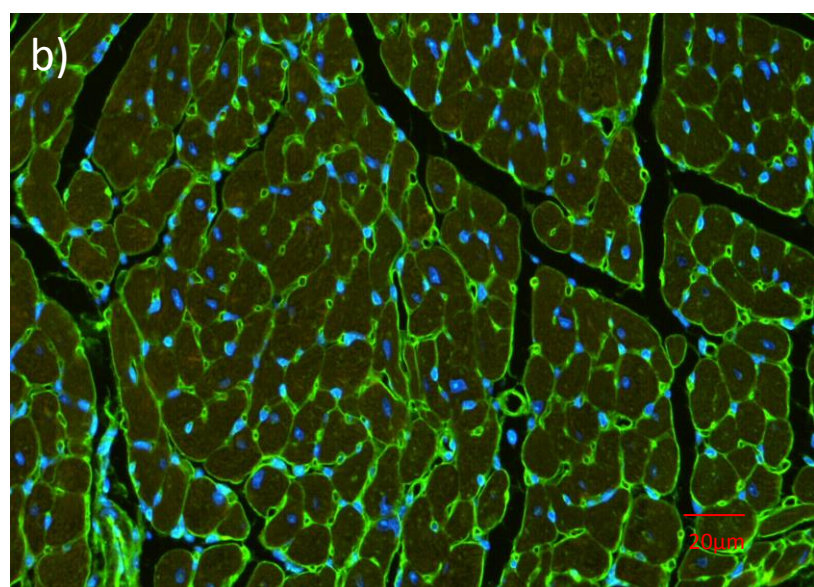
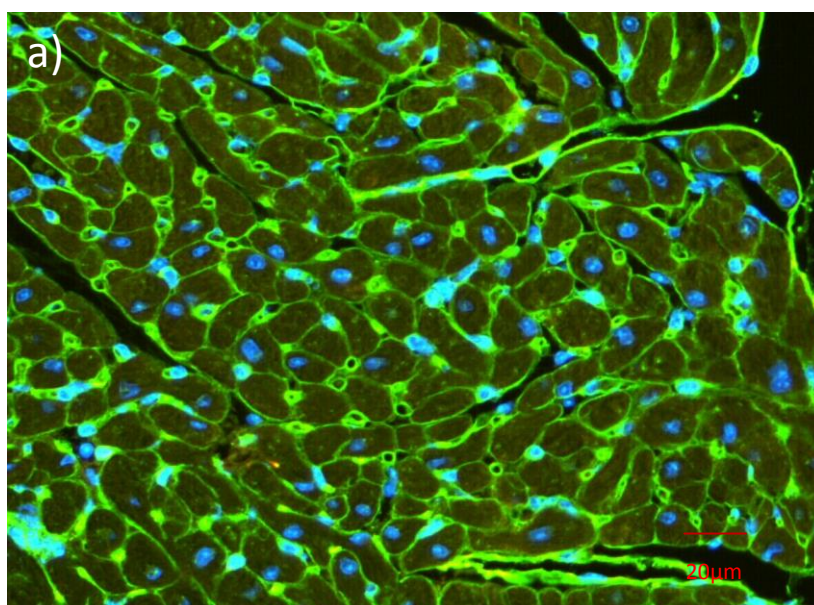
Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 Tag (8mg/kg) 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op



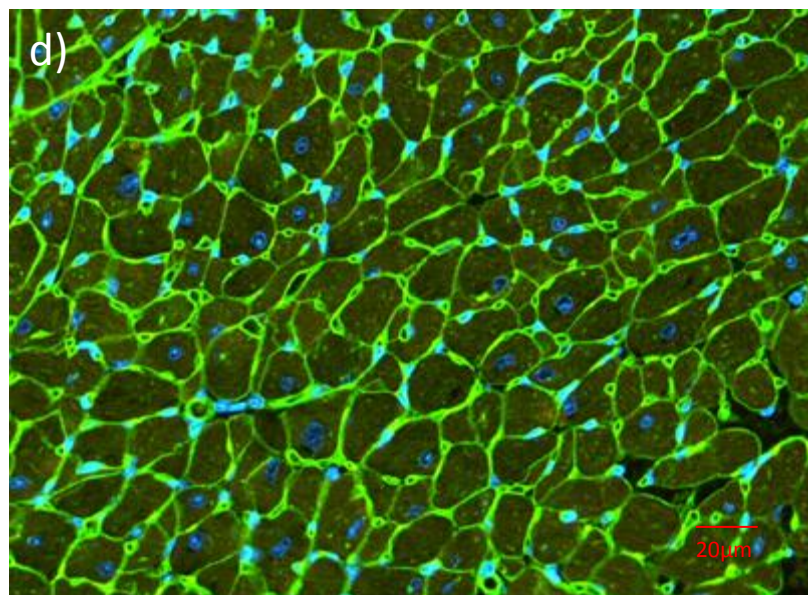
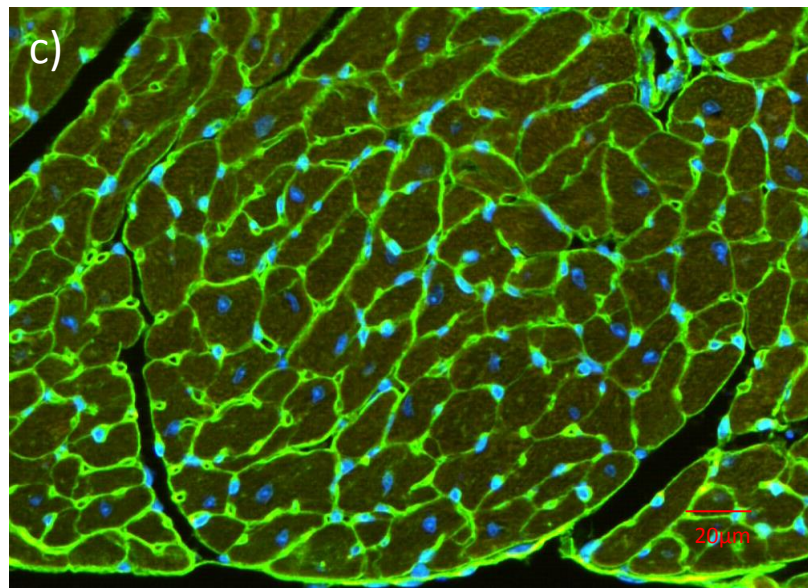


Abbildung 31: WGA-FITC-Färbung zur Darstellung der Kardiomyocyten

a) einer Sham-Maus; **b)** einer Placebo-behandelten Maus; **c)** einer mittels Antagomir-21-behandelten Maus; **d)** einer mittels Co-Antagomir-behandelten Maus
(Vergrößerung: 400fach)

4.5 Knockdown-Verifizierung miRNA-21

Zum Beweis der Wirksamkeit des Antagomirs wurde der Knockdown der miRNA-21 mittels RT-PCR verifiziert. Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen waren keine signifikanten, aber dennoch deutliche Unterschiede sichtbar. Bezogen auf die Placebo (PBS)-Gruppe ($100\% \pm 20$) wiesen die Tiere der Kontrollantagomir-Gruppe $83\% \pm 9$, die Tiere der Co4+A-Antagomir-Gruppe $72\% \pm 8$ und die Tiere der Antagomir-21-Gruppe $47\% \pm 12$ des Gehaltes an miRNA-21 auf.

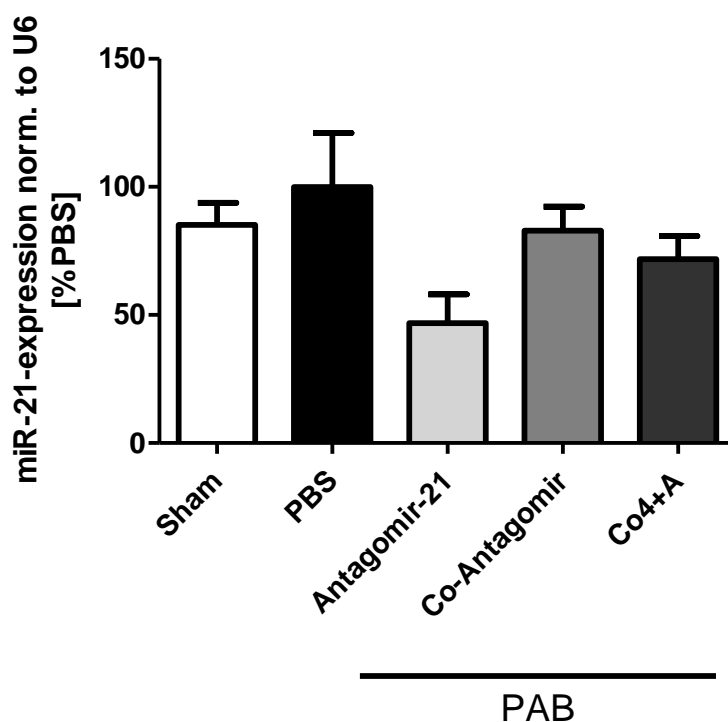


Abbildung 32: Knockdown-Verifizierung der miRNA-21 in Bezug auf die Placebo-Gruppe, normiert zu U6; ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, n=5-6

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.6 ELISA NT-proBNP

Der Gehalt an NT-proBNP im Plasma betrug bei den Sham-Mäusen im Mittel 577 pg/μl ± 68; bei den Placebo-behandelten Mäusen 1618 pg/μl ± 267. Diese beiden Gruppen wiesen somit einen signifikanten Unterschied auf. In den übrigen Gruppen sank der Gehalt an NT-proBNP im Serum im Vergleich zu den Placebomäusen, allerdings war der Unterschied nicht signifikant.

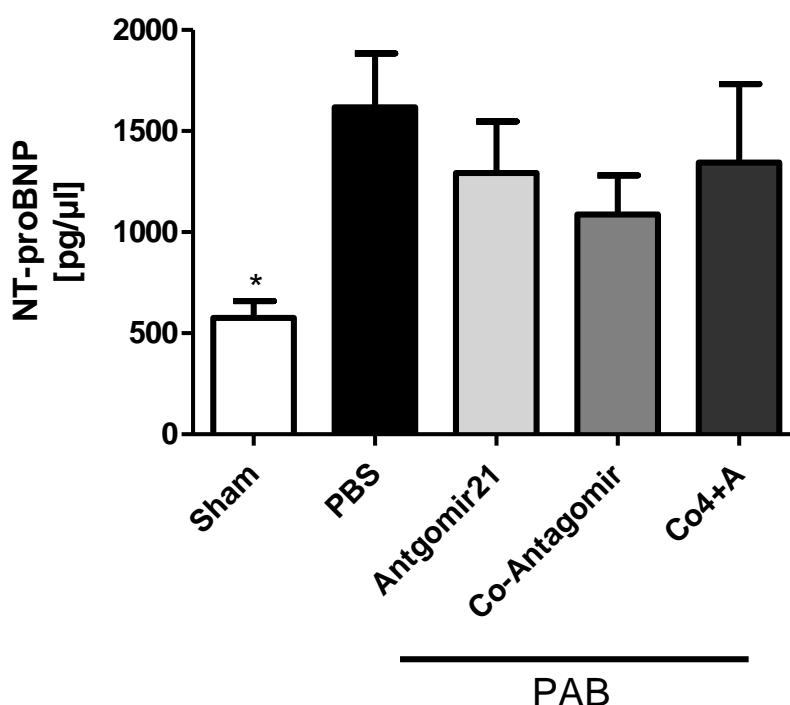


Abbildung 33: ELISA NT-proBNP

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, * $p \leq 0,05$ bezogen auf PBS, n=10-12

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 Tag (8mg/kg) 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.7 Western Blots

4.7.1 ERK1/2

Der Expressionsgehalt von ERK 1/2 bezogen auf GAPDH war in der Sham-Gruppe signifikant erhöht ($139,2\% \pm 4,8$). In den PAB-Gruppen lagen relativ einheitliche Werte vor (PBS: $99,9\% \pm 4,1$; Antagomir-21: $94,4\% \pm 1,1$; Co-Antagomir: $97,0\% \pm 9,0$; Co4+A: $103,7\% \pm 2,3$).

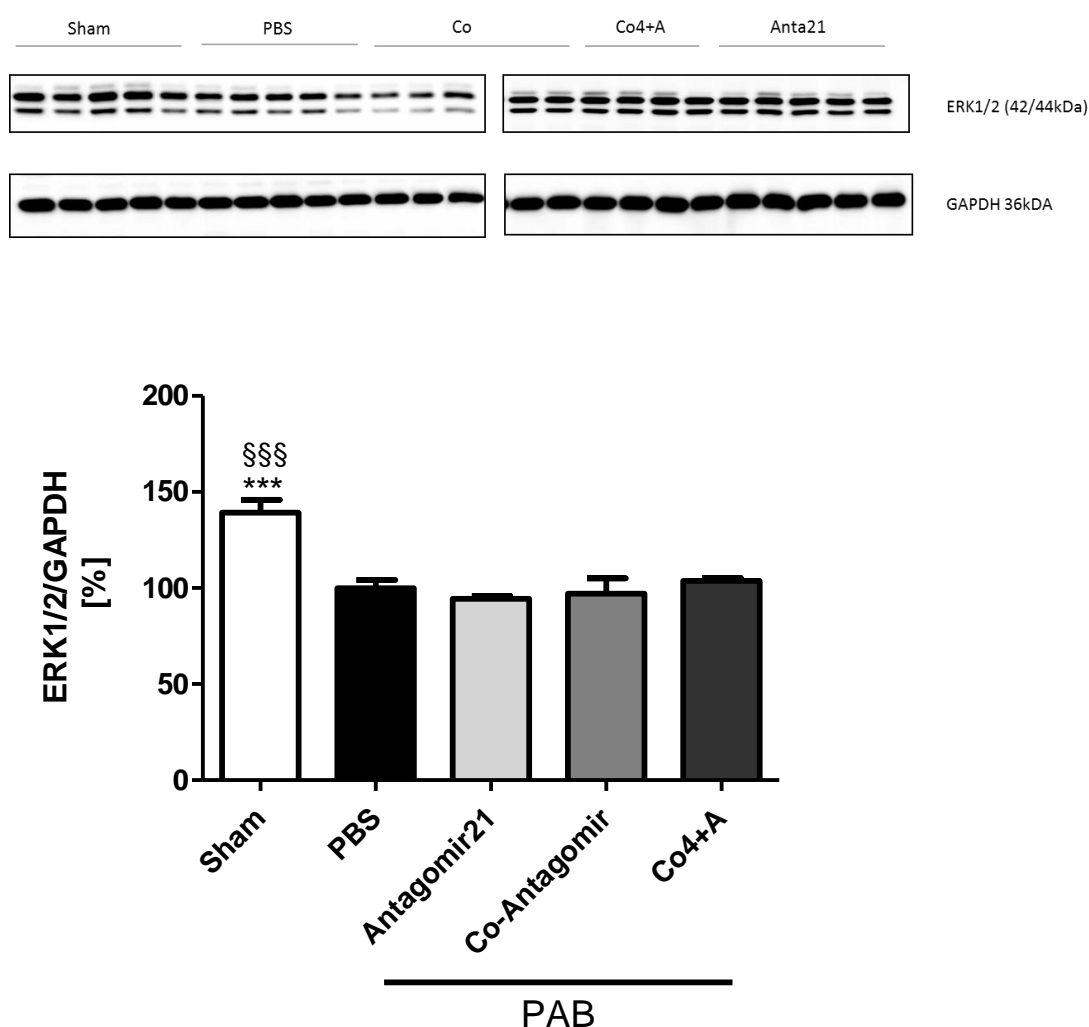


Abbildung 34: Western Blot ERK1/2 / GAPDH

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, *** $p \leq 0,001$ bezogen auf PBS; §§§ $p \leq 0,001$ bezogen auf Antagomir21, n=4-5

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 Tag (8mg/kg) 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.7.2 p-ERK 1/2

Die Expressionsgehalte von p-ERK 1/2/GAPDH waren in der Antagomir-21- und der Co4+A-Gruppe signifikant erhöht, während die Sham-Gruppe und auch die PAB-Tiere in der PBS- und Co-Antagomir-Gruppe signifikant niedrigere Expressionsgehalte aufwiesen (Sham: $133,6\% \pm 8,4$; PBS: $103,9\% \pm 3,1$; Antagomir-21: $246,9\% \pm 36,1$; Co-Antagomir: $61,0\% \pm 5,8$; Co4+A: $196,3\% \pm 38,7$).

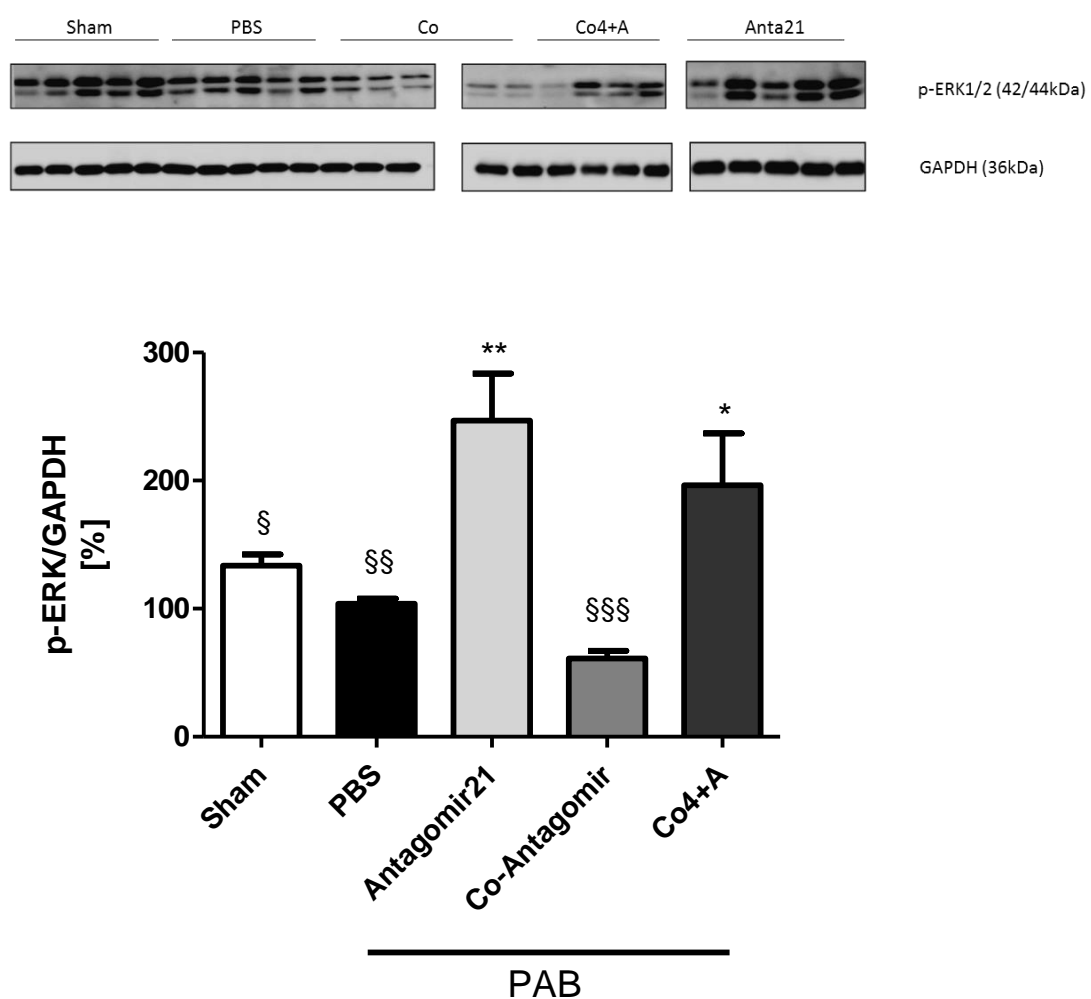


Abbildung 35: Western Blot p-ERK1/2 / GAPDH

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ bezogen auf PBS; § $p \leq 0,05$, §§ $p \leq 0,01$, §§§ $p \leq 0,001$ bezogen auf Antagomir21, $n=4-5$

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 Tag (8mg/kg) 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

4.7.3 Sprouty 1

Die Sham-Mäuse zeigten signifikant höhere Expressionsgehalte an Sprouty1/GAPDH ($533,5\% \pm 92,5$). In den PAB-Gruppen lagen deutlich niedrigere Expressionsgehalte vor, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Banding-Gruppen (PBS: $146,8\% \pm 47,2$; Antagomir-21: $133,3\% \pm 16,7$; Co-Antagomir: $128,7\% \pm 9,3$; Co4+A: $92,1\% \pm 18,0$).

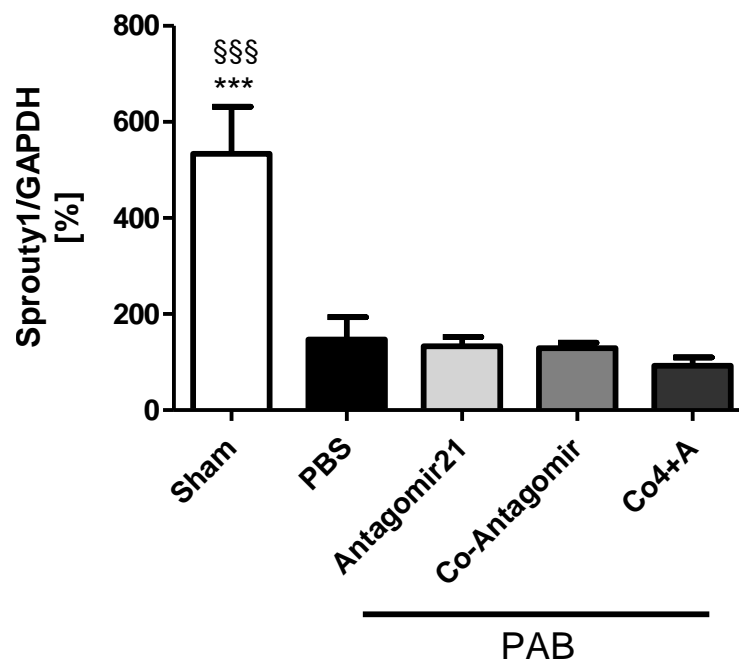
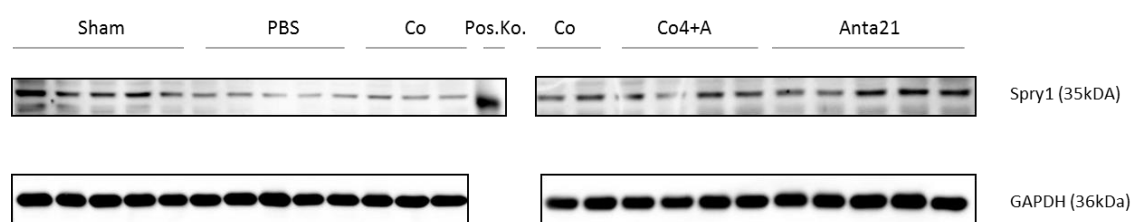


Abbildung 36: Western Blot Sprouty1 / GAPDH

ANOVA, Newman-Keuls-post-hoc-Test, *** $p \leq 0,001$ bezogen auf PBS; §§§ $p \leq 0,001$ bezogen auf Antagomir21, n=4-5

Sham = gesunde Kontrolltiere, ohne Therapie

PBS = PAB-Placebogruppe, behandelt mit PBS

Antagomir21 = PAB-Therapiegruppe, therapiert mit Antagomir-21 (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

Co4+A-Antagomir = PAB-Therapiekontrollgruppe, therapiert mit Co4+A-Antagomir (8mg/kg) Tag 7-13 post op

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung des Antagomir-21 als neuartiges Therapeutikum zur Behandlung der rechtsventrikulären Hypertrophie und Fibrose. Mit Hilfe des Tiermodells des Pulmonalarteriellen Bandings bei der Maus konnte das rechte Herz isoliert von Veränderungen im Lungengefäßsystem betrachtet werden. Da die rechtsventrikuläre Funktion ein entscheidendes Kriterium für die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit angeborenen Herzerkrankungen, chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen oder Pulmonaler Hypertonie ist, gilt es, diese Funktion zu erhalten bzw. zu stärken (Haworth, 2007), (Haddad et al., 2008).

5.1 Pulmonalarteriellles Banding (PAB)

PAB ist das Tiermodell der Wahl, wenn es darum geht, durch Druck- und Volumenüberlastung entstandene Veränderungen im rechten Herzen isoliert von Veränderungen im Lungengefäßsystem zu betrachten (Tarnavski et al., 2004).

PAB wurde 1994 zum ersten Mal in der Maus als Modell für rechtsventrikuläre Hypertrophie und Rechtsherzversagen angewandt (Rockman et al., 1994). Aber erst 2003 veröffentlichten Tarnavski et al. ein Paper, in dem die Durchführung der Operation bei der Maus so detailliert beschrieben wurde, dass das Vorgehen von anderen Forschergruppen übernommen werden konnte und sich weltweit etablierte: Mittels einer 26 G-Kanüle, die beim Abbinden mit einem Seidenfaden neben der Pulmonalarterie platziert wurde, wurde der Durchmesser vorgegeben, auf den die Arterie verengt werden sollte. Nach Anbringen der Ligatur wurde die Kanüle wieder entfernt (Tarnavski et al., 2004).

In unserem Labor wurde die OP-Technik dahingehend modifiziert, dass die Arterie nicht mittels Kanüle und Faden verengt wurde, sondern dass stattdessen ein Titanclip verwendet wurde. Dieser Clip wurde mittels einer dafür vorgesehenen Zange angebracht. Die Arretierung der Zange konnte so eingestellt werden, dass der Clip bis zu einem bestimmten Durchmesser geschlossen werden konnte und die Pulmonalarterie damit auf ca. 0,35mm Durchmesser verengt war.

Das Banding mittels Clip war in unserem Labor bereits eine etablierte Methode.

Die Applikation des Clips ist verglichen mit dem Anbringen einer Ligatur deutlich schneller durchzuführen, da kein zusätzliches Hilfsmittel, welches den Durchmesser der Arterie vorgibt, nötig ist. Dieses verkürzt die Operationsdauer und minimiert die Belastung der Maus. Zudem bleibt der Clip nach dem Anbringen stabil verschlossen, während sich der Knoten einer Fadenligatur im Laufe der Zeit leicht lösen kann.

Die Operationsdauer betrug durchschnittlich 20 min./Maus und die Belastung durch die Narkose konnte für die Maus durch die gute Steuerbarkeit der verwendeten Inhalationsnarkose gering gehalten werden.

5.2 Versuchsaufbau

Bereits vor Beginn dieser Studie wurden in unserem Labor Untersuchungen unter Verwendung des PAB-Modells durchgeführt. Diese konnten zeigen, dass sich bereits 7 Tage post op, als Reaktion auf die durch das Banding verursachte Erhöhung der Nachlast, eine manifeste rechtsventrikuläre Hypertrophie mit kardialen Funktionseinschränkungen ausbildet. Daher wurde dieser Zeitpunkt sowohl für die erste echokardiographische Messung als auch für den Beginn der Therapie gewählt. Die Wahl des Therapiezeitraumes von 14 Tagen/3 Injektionen basierte ebenfalls auf Erfahrungen früher durchgeführter Versuche.

Die eingesetzte n-Zahl betrug 10-12 Tiere pro Gruppe. Bei der Festlegung der Gruppengröße wurde die statistische Genauigkeit gegenüber tierschutzrechtlichen und ethischen Gesichtspunkten abgewogen.

Das eingesetzte Antagomir wurde an der Goethe-Universität Frankfurt am Main hergestellt. Aufgrund von Ergebnissen aus dort durchgeführten Vorversuchen wurde die in dieser Studie eingesetzte Dosierung von 8mg/kg gewählt. Zudem wurden 22-Nukleotide-lange Antagomire eingesetzt, die komplementär zur gesamten Länge der miRNA-21 waren. In der Literatur ist eine bessere Wirksamkeit dieser langen Antagomire beschrieben, verglichen mit Studien, in denen Antagomire eingesetzt wurden, die aus weniger Nukleotiden bestanden und somit nur komplementär zu einem Teil der miRNA waren (Thum et al., 2008) (Patrick et al., 2010), (Krutzfeldt et al., 2007).

Die Behandlung mittels Antagomir respektive Placebo wurde von allen Mäusen gut toleriert; unter der Behandlung traten keine Todesfälle auf.

Um die Ergebnisse bestmöglichst abzusichern, wurden in dieser Studie 2 verschiedene Kontrollantagomire (Co-Antagomir und Co4+A-Antagomir), die eine unterschiedliche Reihung der Nukleotide aufwiesen und daher nicht komplementär zur miRNA-21 waren, eingesetzt. Beide Kontrollantagomire dienten als Kontrolle, um die Wirksamkeit des spezifischen Antagomir-21 zu untermauern. Als Beweis für die Wirksamkeit des Antagomir-21 wurde in der Universität Frankfurt am Main mittels real-time-PCR der Knockdown der miRNA-21 in den verschiedenen Gruppen verifiziert. Hierfür wurde Gewebe des linken Ventrikels verwendet, da es sich um einen globalen Knockdown handelt. Die erwartete Herunterregulation in der mit Antagomir-21 behandelten Gruppe war deutlich, wenn auch nicht signifikant, sichtbar. Im Vergleich zur Placebo-Gruppe sank der Gehalt an miRNA-21 im Gewebe des linken Ventrikels auf 47%. Unerwartet war jedoch, dass auch bei den beiden Kontrollantagomiren eine Herunterregulation sichtbar war (Co4+A-Antagomir: 72%, Co-Antagomir: 83%) (vgl. S. 94).

Auch im Rahmen der Fibroseauswertung ließ sich eine geringgradige Wirksamkeit der Kontrollantagomire verzeichnen (vgl. S. 89).

Nun stellt sich die Frage, wie diese partielle Wirksamkeit der Kontrollantagomire zu erklären ist, obwohl ihre Basensequenz nicht komplementär zur miRNA-21 ist: Um eine bessere Verteilung im Körper und eine bessere Stabilität der Antagomire zu gewährleisten, werden diese bei der Herstellung mit Cholesterol konjugiert. Daher vermutet man, dass diese Cholesterolkonjugation einen kardioprotektiven Effekt hat (Patrick et al., 2010). Zudem wäre es denkbar, dass die Kontrollantagomire zufällig so konzipiert wurden, dass sie komplementär zu anderen miRNAs sind, die im Rahmen von Herzkreislauferkrankungen ebenfalls eine Rolle spielen, aber eventuell noch nicht bekannt sind.

5.3 Herstellung und Wirkungsweise der Antagomire

Im Rahmen von Herzkreislauferkrankungen kommt es zu einer veränderten Expression verschiedenster miRNAs (Cheng et al., 2007), (van Rooij et al., 2006).

Um zu evaluieren, welche miRNAs in der Ausprägung von Rechtsherzremodelling und –versagen eine Rolle spielen, wurde in Zusammenarbeit mit der Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Frau Prof. S. Dimmeler ein Screening verschiedenster miRNAs aus Gewebe des rechten Ventrikels von PAB-Mäusen durchgeführt. Es

wurden die Expressionslevel der miRNAs an 6 verschiedenen Zeitpunkten (Tag 3, 7, 14, 21, 28 und 35 post op) sowohl im rechten als auch im linken Ventrikel von PAB- und Sham-Mäusen gemessen. Die auffälligsten Veränderungen zeigten sich im Expressionsprofil der miRNA-21, daher wurde diese auch für die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführte Studie ausgewählt: Bei den PAB-Mäusen zeigte sich im rechten Ventrikel ein kontinuierlicher Anstieg der Expression der miRNA-21 bis Tag 14, danach fiel die Expression bis Tag 35 wieder ab. Im Vergleich zu den Sham-Mäusen war die Expression bei den PAB-Mäusen aber zu jedem Zeitpunkt deutlich erhöht. Der Höhepunkt ergibt sich an Tag 14: Sham: 0,12 zu PAB: 0,84.

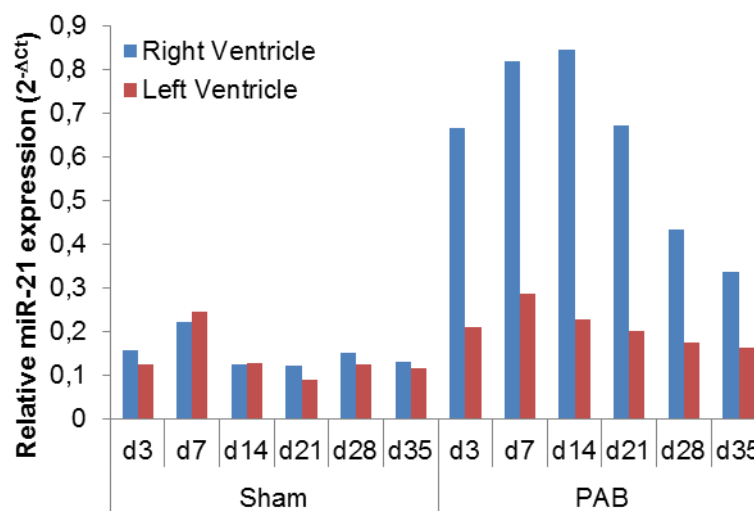


Abbildung 37: Expressionsprofil der miRNA-21

in PAB- und Shamtieren zu verschiedenen Zeitpunkten post op © Universität Frankfurt am Main, Prof. S. Dimmeler

Diese Vorversuche lassen die miRNA-21 als vielversprechendes Target, welches an der Entstehung von kardialen Remodelling beteiligt ist, erscheinen.

Ein weiterer Grund, der für die Auswahl der miRNA-21 in dieser Studie spricht, sind die in 2008 veröffentlichten Ergebnisse von Thum et al., die gegen die miRNA-21 gerichtete Antagomire im Rahmen von Linksherzinsuffizienzstudien einsetzten. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass strukturelle und

funktionale Veränderungen der Linksherzfunktion unter der Behandlung mit Antagomir-21 im Tiermodell sowohl verhindert als auch geheilt werden können. Für diese Verbesserung wurde insbesondere der Einfluss der miRNA-21 auf die Herzfibroblasten verantwortlich gemacht. Bei Hemmung der miRNA-21 mithilfe des entsprechenden Antagomirs kam es zu einer deutlichen Regression von Fibrose und Hypertrophie und einer damit einhergehenden verbesserten Compliance des Herzmuskels (Thum et al., 2008).

Angelehnt an diese Ergebnisse sollte der Einfluss der miRNA-21 auf das rechte Herz untersucht werden.

5.4 Echokardiographie

Die Echokardiographie ist in unserer Arbeitsgruppe eine etablierte Methode zur Erhebung und Auswertung verschiedenster Parameter der Herzfunktion. Da die Untersuchungen von einer extra hierfür ausgebildeten und auf diesem Gebiet erfahrenen Person durchgeführt wurden, waren die Werte sehr verlässlich und reproduzierbar. Die Echokardiographie stellt eine nicht-invasive Methode zur Visualisierung kardiovaskulärer Strukturen und zur Bestimmung der kardialen Funktion dar. Aufgrund der geringen Größe und hohen Schlagfrequenz des Mäuseherzens werden Schallköpfe mit Frequenzen $> 10\text{MHz}$ benutzt (Gao et al., 2011).

Ein Nachteil der echokardiographischen Untersuchung ist, dass diese unter Anästhesie durchgeführt werden muss, was immer eine Beeinflussung des Herz-Kreislaufsystems mit sich bringt. In unseren Studien wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (2%) benutzt. Diese hatte den Vorteil, dass sie leicht ein- und auszuleiten ist, Herzfunktion und Herzfrequenz nur minimal einschränkt und reproduzierbare Daten liefert (Roth et al., 2002).

5.5 Ergebnisse

Das vor der Operation gemessene Körpergewicht und die im Zuge der Organentnahme bestimmte Tibialänge spiegelten eine Einheitlichkeit im Ernährungs- und Entwicklungszustand der Tiere vor dem chirurgischen Eingriff wider und ließen eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Tiere zu. Die Bestimmung der Herzratio, die das

Gewichtsverhältnis zwischen rechtem und linkem Ventrikel inklusive Septum ($RV/(LV+S)$) aufzeigt, ließ eine einheitliche Ausbildung der rechtsventrikulären Hypertrophie in den gebandeten Mäusen erkennen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg dieses Wertes, wobei die Banding-Tiere bis zu doppelt so hohe Werte aufwiesen wie die Sham-Mäuse. In der Literatur sind durchschnittliche Werte von 0,26 bei gesunden Mäusen beschrieben (Weissmann et al., 2007). Diese deckten sich mit den Erkenntnissen aus unserer Studie (durchschnittliche Werte von 0,27). Die signifikante Erhöhung bei den gebandeten Mäusen belegt, dass das PAB den gewünschten Effekt hat.

In der Herzfrequenz ließen sich 3 Wochen post op zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede feststellen. Eine Verlangsamung der Herzfrequenz ist normalerweise nur intraoperativ zu beobachten, zum Zeitpunkt des Anbringens der Ligatur/des Clips, da das rechte Herz sich erst an den plötzlich auftretenden erhöhten Druck adaptieren muss (Tarnavski et al., 2004). Eigene Erfahrungen zeigen, dass dieses aber innerhalb von Minuten geschieht, so dass das Herz die normale Schlagfrequenz wieder aufnimmt.

Signifikante Unterschiede zwischen den PAB- und Sham-Mäusen zeigten sich aber im rechtsventrikulären systolischen Blutdruck, dem rechtsventrikulären enddiastolischen Blutdruck und auch im systolischen systemischen Blutdruck. Der Anstieg des rechtsventrikulären systolischen Blutdrucks (auf doppelt so hohe Werte wie bei gesunden Tieren) ist durch den erhöhten Widerstand, der durch das Banding erzeugt wurde, bedingt (Tarnavski et al., 2004). Das rechte Herz, das normalerweise dafür ausgelegt ist, Blut in das Niedrigdrucksystem des Lungenkreislaufs zu pumpen, muss nun einen deutlich höheren Druck aufbauen, um die erhöhte Nachlast überwinden zu können. Initial können diese Widrigkeiten durch kompensatorische Hypertrophie des rechten Ventrikels ausgeglichen werden (Bogaard et al., 2009). Die Erhöhung des rechtsventrikulären enddiastolischen Druckes und auch des systolischen systemischen Blutdruckes verdeutlichen allerdings bereits eine Funktionseinschränkung des rechten Ventrikels, was zeigt, dass das Stadium der dekompenzierten Herzinsuffizienz erreicht ist (Voelkel et al., 2006). Jetzt ist nicht mehr isoliert das rechte Herz betroffen, sondern es sind bereits Auswirkungen auf das gesamte Herz vorhanden. Im rechten Ventrikel liegt bereits eine diastolische Dysfunktion vor, gekennzeichnet durch ein vermindertes Relaxations- und Füllungsvermögen, bedingt durch ein schlechteres

Dehnungsvermögen und eine Dilatation des rechten Ventrikels aufgrund des myokardialen Remodellings (Voelkel et al., 2006). Die diastolische Insuffizienz und Volumenüberlastung des rechten Ventrikels wirkt sich früher oder später auf die Hämodynamik des gesamten Herzens aus, da das Auswurfvolumen des rechten Herzens und damit die Perfusion der Lunge gemindert ist. Das führt nach dem Frank-Starling-Mechanismus dazu, dass der venöse Zustrom zum linken Herzen sinkt, es zu einer verminderten Vorlast im linken Ventrikel kommt und somit die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels abnimmt (Stone, 2008). Kompensatorisch kommt es in den Gefäßen des großen Kreislaufs zu einer Vasodilatation, um die Nachlast für das linke Herz zu senken. Dieses führt zur Senkung des systemischen Blutdrucks (Budev et al., 2003). Zudem kommt es durch die Dilatation und Volumenüberlastung im rechten Ventrikel dazu, dass das Septum in Richtung des linken Ventrikels gedrückt wird. Hierdurch wird das Volumen des linken Ventrikels verkleinert, es kann weniger Blut aufgenommen (sinkende Vorlast) und ausgeworfen werden (sinkendes CO) (Haddad et al., 2008), (Budev et al., 2003), (Stone, 2008).

Die Echokardiographie wurde durchgeführt, um Aussagen über die Funktion des Herzens treffen zu können. Alle erhobenen Befunde sprachen für eine signifikante Verbesserung der myokardialen Funktion unter der Therapie mit Antagomir-21, auch wenn keine Werte erreicht werden konnten, die denen gesunder Mäuse entsprachen.

In der Histologie wurde der Grad der Fibrose mittels Picrosirius-Rot-Färbung ermittelt. Hier wurden klare, wenn auch nicht signifikante Unterschiede zwischen den Sham- und PAB-Gruppen deutlich: Während der Gehalt an Gesamtkollagen bei den Sham-Tieren 0,2% betrug, wiesen die Herzen der PAB-Tiere in den Kontrollgruppen Kollagengehalte von 8% im Mittel auf. Bei den behandelten Tieren sank der Kollagengehalt auf 5,3% im Mittel. Dieses lässt sich aber darauf zurückführen, dass die verminderte Fibrosierung des Herzmuskels entscheidend zur in der Echokardiographie gezeigten Verbesserung der Herzfunktion beiträgt. Wie Thum et al. 2008 in ihrer Studie bezüglich der Hemmung der miRNA-21 bei Linksherzinsuffizienz zeigen konnten, lag auch hier der größte Einfluss der miRNA-21 in der Ausprägung myokardialer Fibrose. Auch im linken Herzen führte die Behandlung mit dem spezifischen Antagomir-21 zu verminderter Fibrose im Herzen (Thum et al., 2008).

Die Einlagerung von Kollagen im Herzmuskel lässt diesen versteifen (Topkara and Mann, 2011). In der Diastole ist der Ventrikel nicht mehr in vollem Umfang in der Lage, sich zu entspannen und die erforderliche Blutmenge aufzunehmen. Auch die systolische Kontraktionsleistung wird durch die eingelagerten fibrotischen Bezirke im Herzmuskel beeinträchtigt (Khan and Sheppard, 2006). Des Weiteren kommt es zu Einschränkungen bei der Reiz- und Erregungsleitung im Herzen, da die fibrotischen Bezirke eine Übertragung der Reize zwischen den Kardiomyozyten einschränken (Berk et al., 2007).

Weiterhin wurde histologisch der Kardiomyozytendurchmesser mittels WGA-FITC-Färbung bestimmt, um Rückschlüsse auf die Ausbildung rechtsventrikulärer Hypertrophie ziehen zu können. Im Gegensatz zu Thum et al. konnten in unserer Studie keine signifikanten Veränderungen bezüglich der rechtsventrikulären Hypertrophie unter der Antagomir-21-Therapie beobachtet werden, so dass man annehmen kann, dass die Hypertrophie nicht durch die miRNA-21 beeinflusst wird. Gleiche Erkenntnisse wurden bereits in anderen Studien bezüglich der Wirkung von miRNA-21 auf Herzhypertrophie gewonnen (Pullamsetti et al., 2012). Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich bei der Hypertrophie um einen kompensatorischen funktionserhaltenden Prozess handelt, der bis zu einem gewissen Maß dafür sorgt, dass die Herzfunktion trotz widriger Umstände aufrechterhalten werden kann. Des Weiteren wurde bereits von anderen Forschergruppen die Erkenntnis erlangt, dass die rechtsventrikuläre Hypertrophie wesentlich seltener als Todesursache gesehen wird als rechtsventrikuläre Dilatation (van Wolferen et al., 2007).

NT-proBNP ist ein in der Klinik etablierter Laborparameter, der zur Diagnostik und Beurteilung von Therapieeffekten bei Rechtsherzinsuffizienz verwendet wird. Hierbei wird der Gehalt von NT-proBNP im Serum oder Plasma der Patienten bestimmt. Die Höhe der NT-proBNP-Spiegel korreliert mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz respektive dem Überleben der Patienten (Dumitrescu et al., 2008), (Fijalkowska et al., 2006). Unsere Studie ergab keine signifikante Erniedrigung des NT-proBNP-Spiegels im Plasma der mit Antagomir-21 behandelten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollantagomirgruppen. Im Vergleich zur Placebogruppe ist ein leichter, wenn auch nicht signifikanter Abfall der Serumkonzentration zu verzeichnen, allerdings nicht nur in der mit Antagomir-21 behandelten Gruppe, sondern auch in den beiden mit Kontrollantagomir-behandelten Gruppen. Diese ist einerseits eventuell durch eine

relativ hohe Standardabweichung innerhalb der einzelnen Gruppen, andererseits wiederum durch eine kardioprotektive Wirkung der Cholesterol-Konjugation am Antagomir zu erklären.

Mit Hilfe von Westernblots wurde in dieser Studie versucht, die Signalwege und entsprechenden Zielgene, welche von der miRNA-21 beeinflusst werden, zu identifizieren. Thum et al. veröffentlichten 2008 eine Studie zum Einfluss der miRNA-21 auf Linksherzinsuffizienz. Sie konnten zeigen, dass eine Therapie mittels Antagomir-21 im Mausmodell für Linksherzhypertrophie (transaortic constriction (TAC)) zu einer deutlichen Regression der Fibrose und Hypertrophie und somit zu einer verbesserten Funktion des linken Ventrikels führte. Als direktes Zielgen der miRNA-21 identifizierten sie Sprouty1, ein Protein, welches den ERK-MAPK-Signalweg inhibitorisch beeinflusst. Mit Antagomir-21 behandelte Mäuse exprimierten deutlich mehr Sprouty1 und zeigten damit einhergehend eine verminderte Phosphorylierung (Aktivierung) von ERK1/2. Diese Tatsache sahen Thum et al. als Ursache für die verminderte Ausbildung von Linksherzhypertrophie und Fibrose an (Thum et al., 2008).

Ebenfalls im TAC-Modell konnte 2001 eine Aktivierung von ERK1/2 durch chronische Drucküberlastung im linken Ventrikel gezeigt werden (Takeishi et al., 2001). In vivo und in vitro-Experimente zeigten, dass eine Verstärkung des ERK-Signalweges ursächlich an der Ausbildung von Herzhypertrophie beteiligt ist (Bueno and Molkentin, 2002).

Aufgrund dieser bereits publizierten Erkenntnisse wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ebenfalls der ERK-MAPK-Signalweg als potentielle Grundlage für die Beeinflussung der rechtsventrikulären Hypertrophie und Fibrose ausgewählt und das Verhalten einzelner beteiligter Proteine evaluiert:

Im Vergleich zu Sham-Mäusen zeigten die gebandeten Mäuse signifikant niedrigere Expressionslevel an ERK1/2 und in einzelnen Gruppen (Antagomir21 und Co4+A) gleichzeitig höhere Expressionslevel an phosphoryliertem ERK1/2. Dieses spiegelt die Erkenntnis, dass ERK durch Druckbelastung im Herzen aktiviert wird, wider. Die mit PBS und Co-Antagomir behandelten Mäuse wiesen im Vergleich zu den zwei anderen gebandeten Gruppen eine verminderte bzw. unveränderte Aktivierung von ERK auf und es stellt sich die Frage, wie dieses zu erklären ist. Da in verschiedenen Studien eine verstärkte Aktivierung/Phosphorylierung von ERK durch erhöhte Druckbelastung nachgewiesen wurde (Takeishi et al., 2001), (Miyamoto et al., 2004), wäre ein solches Verhalten auch in allen unseren PAB-Gruppen zu erwarten gewesen. Da es sich

allerdings sowohl bei der PBS als auch bei der Co-Antagomir-Gruppe um die am stärksten erkrankten Gruppen handelt, ist das kontroverse Verhalten bezüglich der ERK-Aktivierung vermutlich mit einer Gegenregulation des Körpers zu erklären. Bei zu schwerwiegenden Veränderungen kommt es wahrscheinlich über den Einfluss anderer Signalwege zu einem Kompensationsversuch der pathologischen Prozesse, so dass eine Herunterregulation der ERK-Phosphorylierung erfolgt.

Im Rahmen unserer Studie konnte keine verminderte Aktivierung (Phosphorylierung) von ERK unter der Behandlung mit Antagomir21 festgestellt werden. Auch die Expression von Sprouty1 konnte durch Hemmung der miRNA21 mittels Antagomir nicht erhöht werden. Dies lässt den Schluss zu, dass Sprouty1 im rechten Herzen nicht als direktes Zielgen der miRNA21 fungiert und auch kein Einfluss auf den ERK-MAPK-Signalweg vorliegt. Ähnliche und somit kontroverse Erkenntnisse zu denen von Thum et al. wurden 2010 zu Studien im linken Herzen veröffentlicht: Als Antwort auf TAC kam es zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK, die auch mittels Hemmung bzw. Knock-out der miRNA21 nicht verhindert wurde (Patrick et al., 2010).

Der ERK-MAPK-Signalweg ist an der Ausbildung von Herzmuskelhypertrophie beteiligt (Bueno and Molkentin, 2002). Dass dieser im rechten Herzen durch die Behandlung mittels Antagomir-21 nicht beeinflusst wird, spiegelt sich auch in den histologischen Ergebnissen wieder. Die Auswertung des Kardiomyozytendurchmessers ergab unter der Therapie mit Antagomir-21 keine Veränderung. Eine Regression der Hypertrophie konnte nicht festgestellt werden.

Andererseits kam es unter der Antagomir-Therapie zu einer deutlichen Verbesserung der myokardialen Fibrose. Dieses lässt den Schluss zu, dass die Fibroseentstehung im rechten Herzen über andere Signalwege gesteuert wird, welche es zu identifizieren gilt.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Studie gezeigt werden, dass die Hemmung der miRNA-21 mittels eines spezifischen Antagomirs zu einer deutlichen Verbesserung der myokardialen Funktion führte. Diese Funktionsverbesserung ist in erster Linie durch einen verminderten Fibrosierungsgrad im Herzmuskel zu erklären, der eine verbesserte Compliance des Myokards erlaubt. Trotz unveränderter Ausprägung der rechtsventrikulären Hypertrophie und Bestehenbleiben der erhöhten Drücke (systolisch und enddiastolisch) waren Verbesserungen in der Herzfunktion zu verzeichnen. So kann darauf geschlossen werden, dass die Myokardfibrose in hohem Maße für den Umschwung von kompensierter zu dekomensierter Herzinsuffizienz verantwortlich ist.

Daher scheint eine antifibrotische Therapie für die Erhaltung der Herzfunktion als gewinnbringend und lohnend.

5.6 Klinische Relevanz und Ausblick

Die Funktion des rechten Ventrikels wird im Rahmen verschiedenster Erkrankungen in Mitleidenschaft gezogen. Hierzu gehören Lungenhochdruck, ausgelöst durch verschiedene Lungen- bzw. Lungengefäßerkrankungen, links- oder rechtsventrikuläre Kardiomyopathien, rechtsventrikulärer Infarkt, Herzklappenerkrankungen (Pulmonal- oder Trikuspidalklappe), sowie angeborene Herzerkrankungen mit Links-Rechts-Shunt (Voelkel et al., 2006).

Zur Aufrechterhaltung der kardialen Funktion kommt es kompensatorisch zuerst zu Hypertrophie und Dilatation des rechten Ventrikels. Können diese Kompensationsmechanismen nicht mehr aufrechterhalten werden, tritt Rechtsherzinsuffizienz bis hin zum –versagen auf (Voelkel et al., 2006).

Bis heute sind die genauen Pathomechanismen, die den Umschwung von kompensierter zu dekomensierter Herzinsuffizienz ausmachen, noch nicht bekannt.

Die heute gebräuchlichen Therapien zur Erhaltung der Funktion des Herzens sind symptomatisch und orientieren sich an der zugrunde liegenden Ursache:

Patienten mit primärer Herzinsuffizienz profitieren von Nachlastsenkern, β -Rezeptor-Antagonisten, Inotropika und Diuretika (Voelkel et al., 2006).

Ist das rechte Herz aufgrund von Erkrankungen im Lungengefäßsystem, wie z.B. PH sekundär in Mitleidenschaft gezogen, wird es jedoch schwierig, eine adäquate Therapie zu finden, welche zur Senkung des Widerstands in den Pulmonalgefäßen führt und gleichzeitig die rechtsventrikuläre Funktion verbessert (Bogaard et al., 2009): Eine wirksame PH-Therapie müsste die Kontraktilität in den Kardiomyozyten steigern, gleichzeitig sollen die glatten Muskelzellen der Pulmonalgefäße jedoch entspannt sein. Die Angiogenese soll im Myokard gefördert, in den plexiformen Läsionen der Pulmonalgefäße jedoch verhindert werden. Apoptose soll im Herzen verhindert werden, gleichzeitig möchte man aber erreichen, dass phänotypisch veränderte Endothelzellen in den Pulmonalgefäßen abgebaut werden (Bogaard et al., 2009).

Auch heute noch stellt die Herztransplantation die einzige Heilungschance für Patienten mit schwerwiegenden Rechtsherzerkrankungen dar (Latronico and Condorelli, 2011).

MiRNAs stellen ein relativ neues Feld in der kardiovaskulären Forschung dar. Obwohl sie im Herzen in hohem Maße exprimiert werden, ist die Beteiligung von miRNAs an der Entstehung von Herzkreislauferkrankungen und Herzhypertrophie noch nicht hinreichend geklärt (Lagos-Quintana et al., 2002), (Alvarez-Garcia and Miska, 2005). Seit von Rooij et al. 2006 eine Publikation zur Beteiligung verschiedener miRNAs an der Entstehung von Herzhypertrophie und –versagen veröffentlichten, gewannen diese in der Herzkreislaufforschung eine immense Beachtung. Allein 2010 gab es zu diesem Thema mehr als 120 Veröffentlichungen (Dorn, 2011).

In der von uns durchgeführten Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass durch die Hemmung der miRNA-21 mit Hilfe des spezifischen Antagomir-21 die Funktion des rechten Herzens deutlich verbessert wurde. Im verwendeten Tiermodell des PAB konnte die Reaktion des Herzens auf die verwendete Therapie isoliert von Veränderungen im Lungengefäßsystem evaluiert werden.

Bezüglich der Etablierung des Antagomirs als neuartiges Therapeutikum muss allerdings berücksichtigt werden, dass die ausgewählte miRNA nicht ausschließlich in einem bestimmten Gewebe exprimiert wird. So wurde eine Expression der miRNA-21 neben dem Herz auch in der Leber und in Dünn- und Dickdarm gefunden (Lagos-Quintana et al., 2002). Des Weiteren reguliert eine miRNA nicht einzelne Gene, sondern übt ihre hemmende Funktion meistens auf mehrere Ziel-mRNAs gleichzeitig aus (Gladka et al., 2011). Dieses könnte zu unerwünschten Wirkungen des Antagomirs führen. Andererseits wurde in der von uns durchgeführten Studie aber auch gezeigt, dass das Antagomir nicht zu einem kompletten Knock-Down der miRNA-21 führt, sondern dass deren Expression nur auf 47% herunterreguliert wird. Diese Tatsache könnte die Entstehung von unerwünschten Wirkungen relativieren.

Um das Antagomir-21 als zukunftssträchtiges Therapeutikum für die Behandlung der PAH zu klassifizieren, sollten zusätzlich zur Verbesserung der rechtsventrikulären Funktion auch positive Auswirkungen auf die im Rahmen der PAH entstehenden Veränderungen in der Lunge vorhanden sein.

PAH ist gekennzeichnet durch vaskuläres Remodelling im Bereich der Lungengefäße. Dieses setzt sich zusammen aus verstärkter Muskularisierung der distalen

Lungenarterien (bedingt durch eine Umwandlung von Perizyten in glatte Muskelzellen), fortschreitender Intimahyperplasie, welche zur Verengung des Gefäßdurchmessers führt und dem Auftreten plexiformer Läsionen, eine Endothelzellproliferation, die als Resultat eines frustranen Neovaskularisierungsversuches angesehen wird (Seeger, 2008), (Rabinovitch, 2008).

In verschiedenen aktuellen Studien konnte eine erhöhte Expression der miRNA-21 in der Lunge von Mäusen im Hypoxie- und Bleomycinmodell (etablierte Modelle für PAH und Lungenfibrose), sowie in humanen Lungenproben von PAH-Patienten nachgewiesen werden (Liu et al., 2010), (Yang et al., 2012), (Pullamsetti et al., 2012), (Bockmeyer et al., 2012).

2013 untersuchte die Forschergruppe um Yang et al. im Mausmodell, wie sich die Hemmung der miRNA-21 mittels spezifischem Antagomir auf das vaskuläre Remodelling in der Lunge auswirkte: Es konnte eine verminderte rechtsventrikuläre Hypertrophie (RV/(LV+S) sank), eine verminderte Muskularisierung der distalen Pulmonalarterien, ein Rückgang der angestiegenen α -SMA (smooth muscle actin)-Werte sowie ein vermindertes interstitielles Remodelling in der Lunge festgestellt werden (Yang et al., 2012). Somit führte die Applikation des spezifischen Antagomirs-21 insgesamt zu einem signifikant geringeren Remodelling in der Lunge.

Diese Erkenntnisse untermauern die Eignung des Antagomir-21 als neuartiges Therapeutikum für die Behandlung von PAH, da sowohl, wie in unseren Untersuchungen gezeigt, die Funktion des rechten Ventrikels, als auch gleichzeitig die im Zusammenhang mit dieser Erkrankung auftretenden typischen Veränderungen in der Lunge, positiv beeinflusst werden.

In Zukunft gilt es, die entwickelten Antagomire sofern dies möglich ist, dahingehend zu verfeinern, dass sie gewebspezifisch wirken und möglichst selektiv nur die für die Entstehung der Krankheit verantwortlichen mRNAs / Proteine binden. Hierfür ist es nötig, die Zielproteine, die einerseits an der Entstehung von Herzhypertrophie und -fibrose, andererseits am vaskulären Remodelling in der Lunge beteiligt sind, möglichst genau zu definieren.

6 Zusammenfassung

Rechtsventrikuläre Hypertrophie tritt primär im Rahmen von verschiedenen Herzerkrankungen auf. Wesentlich bedeutender ist sie jedoch als sekundäre Erscheinung im Zusammenhang mit Lungenerkrankungen, wie zum Beispiel dem Pulmonalarteriellen Hochdruck.

Rechtsherzversagen entsteht durch den Umschwung von kompensierter zu dekomensierter Herzinsuffizienz; dieser Prozess ist ausschlaggebend für das Überleben der Patienten. Die hieran beteiligten Mechanismen sind bisher noch nicht genau bekannt.

Daher wird daran gearbeitet, neuartige Behandlungsstrategien zu entwickeln, die der Entstehung von kardialen Remodelling, wie kardialer Fibrose, Hypertrophie und Dilatation, entgegenwirken.

Ein neues Feld in der kardiovaskulären Forschung sind miRNAs, endogene, kurze (~ 22 Nukleotide-lange), einzelsträngige, nicht-kodierende RNAs, die die Genexpression in den meisten Fällen negativ auf posttranskriptionaler Ebene regulieren.

Anfang des neuen Jahrtausends wurden zum ersten Mal Substanzen entwickelt und eingesetzt, die die Funktion dieser miRNAs hemmen können. Es handelt sich hierbei um sogenannte Antagomire.

Ausgehend von verschiedenen Veröffentlichungen und Untersuchungen zur Beteiligung einzelner miRNAs an der Entstehung von Herzkreislauferkrankungen, wurde in dieser Studie die Beteiligung der miRNA-21 an der Entstehung von Rechtsherzhypertrophie und –fibrose untersucht.

Das als Tiermodell eingesetzte Pulmonalarterielle Banding bei der Maus führte zur Ausbildung rechtsventrikulärer Hypertrophie, signifikanter Druckerhöhung im rechten Ventrikel, zum kardialen Remodelling (myokardiale Fibrose, rechtsventrikuläre Dilatation) und zu vermehrter Expression der miRNA-21.

Als Therapeutikum wurde 7 Tage nach der Operation ein cholesterolkonjugiertes, spezifisches Antagomir-21 in einer Dosierung von 8mg/kg eingesetzt. Es wurde dreimalig in dreitägigem Abstand als intravenöse Injektion verabreicht.

Das Ansprechen der Therapie wurde mittels Echokardiographie, hämodynamischer Messung und Histologie evaluiert.

Die Ausbildung der rechtsventrikulären Hypertrophie konnte durch das eingesetzte Antagomir nicht vermindert werden. In der Echokardiographie zeigte sich unter der Therapie aber eine signifikante Verbesserung der rechtsventrikulären Funktionsparameter. Als primäre Ursache dieser Funktionsverbesserung ist die in der Histologie festgestellte verminderte Ausprägung der myokardialen Fibrose zu sehen. Dadurch wird eine verbesserte Compliance des rechten Ventrikels ermöglicht.

Wir konnten zeigen, dass die Hemmung des miRNA-21 mittels eines spezifischen Antagomirs eine neuartige Therapieoption für die Behandlung von rechtsventrikulärer Hypertrophie und –fibrose darstellen könnte.

7 Summary

Primary right ventricular hypertrophy is an indicator of different cardiac diseases. Much more important is its secondarily occurrence resulting from pulmonary diseases, e.g. pulmonary arterial hypertension.

Right ventricular failure develops when compensated right ventricular insufficiency turns to decompensated right ventricular insufficiency. This process highly determines the patients outcome. To date the underlying pathological mechanisms are unknown.

Therefore people are keen on developing novel treatment strategies, to impede the formation of cardiac remodeling, such as cardiac fibrosis, hypertrophy and dilatation.

MiRNAs are a relatively new field in cardiovascular research. They are endogenous, short (~22 nucleotides in length), single-stranded non-coding RNAs, which negatively regulate gene expression at the posttranscriptional level.

At the beginning of the new millenium miRNA-blocking-compounds were developed for the first time. These substances were called antagomirs.

Based on previous studies and publications dealing with the involvement of miRNAs in the development of cardiovascular diseases, this dissertation focused on the role of miRNA-21 in right ventricular hypertrophy and fibrosis.

Pulmonary Arterial Banding in mice led to right ventricular hypertrophy, significant increase in right ventricular pressure, cardiac remodeling (myocardial fibrosis, right ventricular dilatation) and to an increased expression of miR-21.

As a therapeutic agent we used a cholesterol-conjugated specific Antagomir-21 at a dosage of 8mg/kg. Therapy was started 7 days post op and the antagomir was injected intravenously every third day, 3 times in total.

The therapeutic effect was evaluated using echocardiography, hemodynamic measurements and histology:

Right ventricular hypertrophy was not influenced by this therapy.

Echocardiography revealed a significant improvement of right ventricular function in mice when treated with antagomir-21. The reason for this is the reduced formation of cardiac fibrosis, which was also confirmed by histology. This led to an enhanced compliance of the right ventricle.

Our study suggests that the inhibition of miRNA-21 by a specific antagomir might be a novel therapeutic option for treating right ventricular hypertrophy and fibrosis.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Herzens	22
Abbildung 2: Pathophysiologie des Rechtsherzversagens.....	25
Abbildung 3: Entstehung und Wirkungsweise von miRNAs.....	31
Abbildung 4: Wirkungsweise von Sprouty in den verschiedenen Wachstumsfaktor-Signalwegen.....	35
Abbildung 5: schematische Darstellung des PAB.....	49
Abbildung 6: Thorakotomie bei der Maus im Verlauf der PAB-OP.....	51
Abbildung 7: Titanclip a) im Größenvergleich, b) intraoperativ um A. pulmonalis gelegt	51
Abbildung 8: zeitlicher Ablauf des Experiments	53
Abbildung 9: zur echokardiographischen Untersuchung vorbereitete Maus.....	56
Abbildung 10: Short axis view: Dilatation des rechten Ventrikels	56
Abbildung 11: Längsachsenansicht: Konstriktion der Pulmonalarterie durch den Titanclip	57
Abbildung 12: 4-Kammer-Blick.....	57
Abbildung 13: Messung des Druckgradienten über der Pulmonalarterienkonstriktion .	58
Abbildung 14: Körpergewicht zum Zeitpunkt der Operation	75
Abbildung 15: Körpergewicht 3 Wochen post op.....	76
Abbildung 16: Tibialänge 3 Wochen post op	77
Abbildung 17: RV/(LV+S).....	78
Abbildung 18: Herzfrequenz	79
Abbildung 19: Systolischer systemischer Blutdruck.....	80
Abbildung 20: Diastolischer systemischer Blutdruck	81

Abbildung 21: Rechtsventrikulärer systolischer Druck.....	82
Abbildung 22: Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck.....	83
Abbildung 23: Cardiac Output.....	84
Abbildung 24: Cardiac Index	85
Abbildung 25: Rechtsventrikulärer innerer Durchmesser.....	86
Abbildung 26: Myocardial Performance Index.....	87
Abbildung 27: Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion	88
Abbildung 28: Kollagengehalt.....	89
Abbildung 29: Picrosirius-Rot-Färbung zur Darstellung von Kollagen	90
Abbildung 30: Kardiomyocytendurchmesser	91
Abbildung 31: WGA-FITC-Färbung zur Darstellung der Kardiomyocyten	93
Abbildung 32: Knockdown-Verifizierung der miRNA-21 i.....	94
Abbildung 33: ELISA NT-proBNP	95
Abbildung 34: Western Blot ERK1/2 / GAPDH	96
Abbildung 35: Western Blot p-ERK1/2 / GAPDH	98
Abbildung 36: Western Blot Sprouty1 / GAPDH	100
Abbildung 37: Expressionsprofil der miRNA-21	105

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Injektionslösungen und Substanzen	40
Tabelle 2: Übersicht über +die verwendeten Antikörper	42
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien	43
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Geräte.....	45
Tabelle 5: Übersicht über das verwendete Operationsbesteck.....	47

9 Literaturverzeichnis

- ALVAREZ-GARCIA, I. & MISKA, E. A. 2005. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 132, 4653-62.
- BADESCH, D. B., RASKOB, G. E., ELLIOTT, C. G., KRICHMAN, A. M., FARBER, H. W., FROST, A. E., BARST, R. J., BENZA, R. L., LIOU, T. G., TURNER, M., GILES, S., FELDKIRCHER, K., MILLER, D. P. & MCGOON, M. D. 2010. Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest*, 137, 376-87.
- BARTEL, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-97.
- BERK, B. C., FUJIWARA, K. & LEHOUX, S. 2007. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest*, 117, 568-75.
- BERNSTEIN, E., CAUDY, A. A., HAMMOND, S. M. & HANNON, G. J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 363-6.
- BOCKMEYER, C. L., MAEGEL, L., JANCIAUSKIENE, S., RISCHE, J., LEHMANN, U., MAUS, U. A., NICKEL, N., HAVERICH, A., HOEPER, M. M., GOLPON, H. A., KREIPE, H., LAENGER, F. & JONIGK, D. 2012. Plexiform vasculopathy of severe pulmonary arterial hypertension and microRNA expression. *J Heart Lung Transplant*, 31, 764-72.
- BOGAARD, H. J., ABE, K., VONK NOORDEGRAAF, A. & VOELKEL, N. F. 2009. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest*, 135, 794-804.
- BUDEV, M. M., ARROLIGA, A. C., WIEDEMANN, H. P. & MATTHAY, R. A. 2003. Cor pulmonale: an overview. *Semin Respir Crit Care Med*, 24, 233-44.
- BUENO, O. F. & MOLKENTIN, J. D. 2002. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res*, 91, 776-81.
- CABRITA, M. A. & CHRISTOFORI, G. 2008. Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. *Angiogenesis*, 11, 53-62.
- CALLIS, T. E. & WANG, D. Z. 2008. Taking microRNAs to heart. *Trends Mol Med*, 14, 254-60.
- CARRINGTON, J. C. & AMBROS, V. 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 301, 336-8.
- CHENG, Y., JI, R., YUE, J., YANG, J., LIU, X., CHEN, H., DEAN, D. B. & ZHANG, C. 2007. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol*, 170, 1831-40.
- CHENG, Y. & ZHANG, C. 2010. MicroRNA-21 in cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res*, 3, 251-5.
- DAVIS, B. N., HILYARD, A. C., LAGNA, G. & HATA, A. 2008. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*, 454, 56-61.
- DORN, G. W., 2ND 2011. MicroRNAs in cardiac disease. *Transl Res*, 157, 226-35.
- DUMITRESCU, D., TEN FREYHAUS, H. & ROSENKRANZ, S. 2008. [Pulmonary arterial hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr*, 133, 1009-20.

- FABIAN, M. R. & SONENBERG, N. 2012. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol*, 19, 586-93.
- FIEDLER, J., GUPTA, S. K. & THUM, T. 2012. MicroRNA-based therapeutic approaches in the cardiovascular system. *Cardiovasc Ther*, 30, e9-e15.
- FIJALKOWSKA, A., KURZYNA, M., TORBICKI, A., SZEWCZYK, G., FLORCZYK, M., PRUSZCZYK, P. & SZTURMOWICZ, M. 2006. Serum N-terminal brain natriuretic peptide as a prognostic parameter in patients with pulmonary hypertension. *Chest*, 129, 1313-21.
- GAO, S., HO, D., VATNER, D. E. & VATNER, S. F. 2011. Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*, 1, 71-83.
- GLADKA, M. M., DA COSTA MARTINS, P. A. & DE WINDT, L. J. 2011. Small changes can make a big difference - MicroRNA regulation of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*.
- HADDAD, F., DOYLE, R., MURPHY, D. J. & HUNT, S. A. 2008. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation*, 117, 1717-31.
- HAWORTH 2007. The cell and molecular biology of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *European Heart Journal*, 9, H10-H16.
- HE, L. & HANNON, G. J. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 5, 522-31.
- HINES, R. 1991. Right ventricular function and failure: a review. *Yale J Biol Med*, 64, 295-307.
- HOEPER, M. M., ANDREAS, S., BASTIAN, A., CLAUSSEN, M., GHOFrani, H. A., GORENFLO, M., GROHE, C., GUNTHER, A., HALANK, M., HAMMERL, P., HELD, M., KRUGER, S., LANGE, T. J., REICHENBERGER, F., SABLITZKI, A., STAEHLER, G., STARK, W., WIRTZ, H., WITT, C. & BEHR, J. 2011. [Pulmonary hypertension due to chronic lung disease. Recommendations of the Cologne Consensus Conference 2010]. *Pneumologie*, 65, 208-18.
- HUMBERT, M., SITBON, O., CHAOUAT, A., BERTOCCHI, M., HABIB, G., GRESSIN, V., YAICI, A., WEITZENBLUM, E., CORDIER, J. F., CHABOT, F., DROMER, C., PISON, C., REYNAUD-GAUBERT, M., HALOUN, A., LAURENT, M., HACHULLA, E. & SIMONNEAU, G. 2006. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*, 173, 1023-30.
- KHAN, R. & SHEPPARD, R. 2006. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology*, 118, 10-24.
- KRUTZFELDT, J., KUWAJIMA, S., BRAICH, R., RAJEEV, K. G., PENA, J., TUSCHL, T., MANOHARAN, M. & STOFFEL, M. 2007. Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. *Nucleic Acids Res*, 35, 2885-92.
- KRUTZFELDT, J., RAJEWSKY, N., BRAICH, R., RAJEEV, K. G., TUSCHL, T., MANOHARAN, M. & STOFFEL, M. 2005. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, 438, 685-9.

- LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., YALCIN, A., MEYER, J., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 12, 735-9.
- LATRONICO, M. V. & CONDORELLI, G. 2011. Therapeutic use of microRNAs in myocardial diseases. *Curr Heart Fail Rep*, 8, 193-7.
- LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-54.
- LEE, Y., AHN, C., HAN, J., CHOI, H., KIM, J., YIM, J., LEE, J., PROVOST, P., RADMARK, O., KIM, S. & KIM, V. N. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425, 415-9.
- LEE, Y., JEON, K., LEE, J. T., KIM, S. & KIM, V. N. 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, 21, 4663-70.
- LI, X., WHELDON, L. & HEATH, J. K. 2003. Sprouty: a controversial role in receptor tyrosine kinase signalling pathways. *Biochem Soc Trans*, 31, 1445-6.
- LIU, G., FRIGGERI, A., YANG, Y., MILOSEVIC, J., DING, Q., THANNICKAL, V. J., KAMINSKI, N. & ABRAHAM, E. 2010. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med*, 207, 1589-97.
- LUND, E., GUTTINGER, S., CALADO, A., DAHLBERG, J. E. & KUTAY, U. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303, 95-8.
- MIYAMOTO, T., TAKEISHI, Y., TAKAHASHI, H., SHISHIDO, T., ARIMOTO, T., TOMOIKE, H. & KUBOTA, I. 2004. Activation of distinct signal transduction pathways in hypertrophied hearts by pressure and volume overload. *Basic Res Cardiol*, 99, 328-37.
- NAUSER, T. D. & STITES, S. W. 2001. Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Am Fam Physician*, 63, 1789-98.
- ONO, K., KUWABARA, Y. & HAN, J. 2011. MicroRNAs and cardiovascular diseases. *FEBS J*, 278, 1619-33.
- PATRICK, D. M., MONTGOMERY, R. L., QI, X., OBAD, S., KAUPPINEN, S., HILL, J. A., VAN ROOIJ, E. & OLSON, E. N. 2010. Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *J Clin Invest*, 120, 3912-6.
- PRASAD, N. 2009. Unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks. *J Biochem*, 284, 27487-99.
- PULLAMSETTI, S. S., DOEBELE, C., FISCHER, A., SAVAI, R., KOJONAZAROV, B., DAHAL, B. K., GHOFrani, H. A., WEISSMANN, N., GRIMMINGER, F., BONAUER, A., SEEGER, W., ZEIHNER, A. M., DIMMELER, S. & SCHERMULY, R. T. 2012. Inhibition of MicroRNA-17 Improves Lung and Heart Function in Experimental Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 185, 409-19.
- RABINOVITCH, M. 2008. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*, 118, 2372-9.
- REICHENBERGER, F. & VOSWINCKEL, R. 2011. [Pulmonary arterial hypertension]. *Internist (Berl)*, 52, 405-14; quiz 415.
- ROCKMAN, H. A., ONO, S., ROSS, R. S., JONES, L. R., KARIMI, M., BHARGAVA, V., ROSS, J., JR. & CHIEN, K. R. 1994. Molecular and

- physiological alterations in murine ventricular dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 2694-8.
- ROTH, D. M., SWANEY, J. S., DALTON, N. D., GILPIN, E. A. & ROSS, J., JR. 2002. Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282, H2134-40.
- SAYED, D., HONG, C., CHEN, I. Y., LYPOWY, J. & ABDELLATIF, M. 2007. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 100, 416-24.
- SAYED, D., RANE, S., LYPOWY, J., HE, M., CHEN, I. Y., VASHISTHA, H., YAN, L., MALHOTRA, A., VATNER, D. & ABDELLATIF, M. 2008. MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths. *Mol Biol Cell*, 19, 3272-82.
- SCHANNWELL, C. M., STEINER, S. & STRAUER, B. E. 2007. Diagnostics in pulmonary hypertension. *J Physiol Pharmacol*, 58 Suppl 5, 591-602.
- SCHERMULY, R. T., GHOFrani, H. A., WILKINS, M. R. & GRIMMINGER, F. 2011. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol*, 8, 443-55.
- SEEGER, W. 2008. *Klinische Pneumologie*.
- STONE, A. 2008. The right ventricle in pulmonary hypertension. In: HILL, N. (ed.) 1st ed. *Pulmonary Hypertension*.
- TAKEISHI, Y., HUANG, Q., ABE, J., GLASSMAN, M., CHE, W., LEE, J. D., KAWAKATSU, H., LAWRENCE, E. G., HOIT, B. D., BERK, B. C. & WALSH, R. A. 2001. Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch. *J Mol Cell Cardiol*, 33, 1637-48.
- TARNAVSKI, O., MCMULLEN, J. R., SCHINKE, M., NIE, Q., KONG, S. & IZUMO, S. 2004. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics*, 16, 349-60.
- THUM, T., GROSS, C., FIEDLER, J., FISCHER, T., KISSLER, S., BUSSEN, M., GALUPPO, P., JUST, S., ROTTBAUER, W., FRANTZ, S., CASTOLDI, M., SOUTSCHEK, J., KOTELIANSKY, V., ROSENWALD, A., BASSON, M. A., LICHT, J. D., PENA, J. T., ROUHANIFARD, S. H., MUCKENTHALER, M. U., TUSCHL, T., MARTIN, G. R., BAUERSACHS, J. & ENGELHARDT, S. 2008. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 456, 980-4.
- TOPKARA, V. K. & MANN, D. L. 2011. Role of MicroRNAs in Cardiac Remodeling and Heart Failure. *Cardiovasc Drugs Ther*, 25, 171-82.
- VAN ROOIJ, E., SUTHERLAND, L. B., LIU, N., WILLIAMS, A. H., MCANALLY, J., GERARD, R. D., RICHARDSON, J. A. & OLSON, E. N. 2006. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18255-60.
- VAN WOLFEREN, S. A., MARCUS, J. T., BOONSTRA, A., MARQUES, K. M., BRONZWAER, J. G., SPREEUWENBERG, M. D., POSTMUS, P. E. & VONK-NOORDEGRAAF, A. 2007. Prognostic value of right ventricular mass, volume, and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*, 28, 1250-7.

- VOELKEL, N. F., QUAIFFE, R. A., LEINWAND, L. A., BARST, R. J., MCGOON, M. D., MELDRUM, D. R., DUPUIS, J., LONG, C. S., RUBIN, L. J., SMART, F. W., SUZUKI, Y. J., GLADWIN, M., DENHOLM, E. M. & GAIL, D. B. 2006. Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation*, 114, 1883-91.
- WEISSMANN, N., GERIGK, B., KOCER, O., NOLLEN, M., HACKEMACK, S., GHOFrani, H. A., SCHERMULY, R. T., BUTROUS, G., SCHULZ, A., ROTH, M., SEEGER, W. & GRIMMINGER, F. 2007. Hypoxia-induced pulmonary hypertension: different impact of iloprost, sildenafil, and nitric oxide. *Respir Med*, 101, 2125-32.
- YANG, S., BANERJEE, S., FREITAS, A., CUI, H., XIE, N., ABRAHAM, E. & LIU, G. 2012. miR-21 regulates chronic hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 302, L521-9.
- YEOM, K. H., LEE, Y., HAN, J., SUH, M. R. & KIM, V. N. 2006. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res*, 34, 4622-9.
- YOSHIMATSU, Y. & WATABE, T. 2011. Roles of TGF-beta signals in endothelial-mesenchymal transition during cardiac fibrosis. *Int J Inflam*, 2011, 724080.
- ZAFFRAN, S., KELLY, R. G., MEILHAC, S. M., BUCKINGHAM, M. E. & BROWN, N. A. 2004. Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circ Res*, 95, 261-8.
- ZEISBERG, E. M., TARNAVSKI, O., ZEISBERG, M., DORFMAN, A. L., MCMULLEN, J. R., GUSTAFSSON, E., CHANDRAKER, A., YUAN, X., PU, W. T., ROBERTS, A. B., NEILSON, E. G., SAYEGH, M. H., IZUMO, S. & KALLURI, R. 2007. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med*, 13, 952-61.
- ZHU, H. & FAN, G. C. 2011. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis*, 1, 138-149.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die an der Erstellung dieser Arbeit beteiligt waren und zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

Als erstes danke ich meinem Doktorvater und externen Betreuer Prof. Ralph Schermuly: Für die Überlassung des Themas, unkomplizierte Problemlösungen und die Möglichkeit, mein Projekt auch über Institutsgrenzen hinaus präsentieren zu dürfen.

Ich danke Herrn Prof. Martin Diener für die Übernahme der Betreuung im Fachbereich Veterinärmedizin und die schnelle Korrektur dieser Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön an alle Mitglieder der AG Schermuly für die nette und humorvolle Arbeitsatmosphäre - sowohl im BFS als auch im ECCPS.

Es waren 2 schöne Jahre bei euch!

Insbesondere danke ich meinen beiden PostDocs Wiebke Janssen und Kirsten Murmann, die mich mit ihrem Wissen und ihrer Erfahrung von Anfang an unterstützt haben. Ich danke euch für die viele Zeit, die ihr für die Besprechung und Bearbeitung meines Projektes aufgebracht habt, aber auch für Gespräche außerhalb der Arbeit.

Dankeschön an Bakyt Kojonazarov für die Erstellung der Ultraschallaufnahmen und dafür, dass es immer etwas zu lachen gab.

Vielen Dank, Yves, für die Einarbeitung in die Technik des PAB.

Ein großer Dank geht an Christina Vroom, die mit ihrer Hilfsbereitschaft stets zur Lösung verschiedenster Probleme beigetragen hat.

Ich danke meinen Mitstreiterinnen Janina und Svenja für eine lustige Zeit im gemeinsamen Büro und diverse Unternehmungen außerhalb des Instituts.

Weiterhin möchte ich Frau Prof. Dimmeler und ihrer Arbeitsgruppe an der Goethe-Universität Frankfurt am Main für die Herstellung und zur Verfügungstellung des Antagomirs danken. Ein zusätzlicher Dank gilt Frau Ariane Fischer für die Durchführung der RT-PCR zur Knockdown-Verifizierung der miR-21.

Der größte Dank gebührt meiner Familie:

Ohne meine Eltern, die mich sowohl im Studium als auch während meiner Doktorarbeit stets unterstützt und durch alle Höhen und Tiefen begleitet haben, wäre das alles nicht möglich gewesen.

Meiner Schwester danke ich, dass sie immer für mich da ist und für den Feinschliff in Sachen Textverarbeitung an dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an meine Freundin Johanna: Danke, dass ich dich kennengelernt habe und dass du mir meine 2 Doktorarbeitsjahre bereichert hast.

Danke, dass du da bist!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6164-7

